

**BESTIMMUNG UND FUNKTION
DER KATECHOLAMINE
IN DER SPÄTEMBRYONALEN PHASE
DES HÜHNERKÜKENS**

JOSEF PRECHTL

Disbui. München

1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0084

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. J. Wittmann

BESTIMMUNG UND FUNKTION DER KATECHOLAMINE
IN DER SPÄTEMBRYONALEN PHASE DES HÜHNERKÜCKENS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Josef Prechtel
aus
Neukirchen

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr.habil. J. Wittmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

Meinen Eltern

und

Ingrid

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND LITERATUR	1
1.1 Energieversorgung des Embryos	1
1.2 Sauerstoffversorgung des Embryos	2
1.3 Bedeutung der Katecholamine in der prä-natalen und perinatalen Phase	5
1.4 Entwicklung des Nebennierenmarks	6
1.5 Synthese und Inaktivierung der Katecholamine	8
1.6 Regulierung der Synthese und Freisetzung	10
1.7 Adrenozeptoren	12
1.8 Wirkung der Katecholamine auf das cardiovaskuläre System	16
1.9 Wirkung der Katecholamine auf den Kohlenhydratstoffwechsel	17
1.10 Zielsetzung	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Versuchstiere	20
2.2 Reagentien	20
2.3 Bestimmung der Plasmakatecholamine	21

	<i>Seite</i>
2.3.1 <i>Plasmagewinnung</i>	<i>21</i>
2.3.2 <i>Extraktion der Katecholamine</i>	<i>21</i>
2.3.3 <i>Das HPLC-System</i>	<i>23</i>
2.3.4 <i>Chromatographische Bedingungen</i>	<i>23</i>
2.3.5 <i>Identifizierung und Quantifizierung der Katecholamine</i>	<i>24</i>
2.3.6 <i>Prinzip der elektrochemischen (ampero- metrischen) Detektion</i>	<i>26</i>
2.3.7 <i>Prüfung der methodischen Bedingungen</i>	<i>27</i>
2.4 <i>Applikation der Substanzen</i>	<i>28</i>
2.5 <i>Bestimmung des Glykogens in der Leber</i>	<i>29</i>
2.6 <i>Bestimmung von Glucose, Lactat und 2,3-DPG im Blut</i>	<i>30</i>
2.7 <i>Inkubation bei vermindertem pO_2</i>	<i>31</i>
2.8 <i>Bestimmung der Blutgase</i>	<i>31</i>
2.9 <i>Bestimmung des Hämoglobingehalts der Chorioallantoismembran, der Lunge und der Niere</i>	<i>32</i>
2.10 <i>Proteinbestimmung</i>	<i>34</i>
2.11 <i>Blutflußmessung beim Hühnerembryo</i>	<i>34</i>
2.12 <i>Statistische Auswertung</i>	<i>36</i>

	Seite
3. <i>ERGEBNISSE</i>	37
3.1 <i>Bestimmung der Plasmakatecholaminkon-</i> <i>zentration in der spätembryonalen</i> <i>Entwicklungsphase</i>	37
3.1.1 <i>Einteilung in Entwicklungsstadien</i>	37
3.1.2 <i>Plasmakatecholaminkonzentration in ver-</i> <i>schiedenen Entwicklungsstadien</i>	39
3.1.3 <i>Verlauf der anteilsmäßigen Verteilung</i> <i>von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin</i> <i>am Gesamtkatecholamingehalt</i>	41
3.1.4 <i>Einfluß von Hypoxie auf die Plasma-</i> <i>katecholaminkonzentration</i>	43
3.2 <i>Einfluß von adrenerg wirksamen Sub-</i> <i>stanzen und von Hypoxie auf den Kohlen-</i> <i>hydratstoffwechsel</i>	44
3.3 <i>Einfluß der Katecholamine auf die Sauer-</i> <i>stoffversorgung</i>	55
3.3.4 <i>Einfluß von Adrenozeptoren-blockierenden</i> <i>Substanzen auf die Überlebenszeit von</i> <i>Hühnerembryonen bei O₂-Mangel</i>	59

	<i>Seite</i>
3.4 <i>Einfluß von Katecholaminen auf den Blut-</i>	
<i>kreislauf von Hühnerembryonen</i>	<i>62</i>
3.4.1 <i>Einfluß von adrenerg wirkenden Sub-</i>	
<i>stanzen auf den Hämoglobingehalt von</i>	
<i>Chorioallantoismembran, Lunge und Niere</i>	<i>62</i>
3.4.2 <i>Einfluß von adrenerg wirkenden Sub-</i>	
<i>stanzen auf die Durchblutung der Chorio-</i>	
<i>allantoismembran</i>	<i>64</i>
4. <i>DISKUSSION</i>	<i>69</i>
5. <i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	<i>82</i>
<i>SUMMARY</i>	<i>84</i>
7. <i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	<i>86</i>

1. EINLEITUNG UND LITERATUR

1.1 Energieversorgung des Embryos

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase, zur Entwicklung und zum Wachstum benötigt der Organismus Energie. Diese bezieht er zum überwiegenden Teil aus dem oxidativen Abbau von Kohlenhydraten und Fetten.

Dem Säugerembryo werden diese lebenswichtigen Substanzen über den engen Kontakt zwischen placentarem und mütterlichem Kreislauf zugeführt. Demgegenüber erfolgt die Versorgung des Vogelembryos aus den Eivorräten.

Das Vogelei enthält vor allem Lipide und Proteine, jedoch kaum Kohlenhydrate (84). Die geringen Kohlenhydratvorräte werden vom Hühnerembryo schon innerhalb der ersten Inkubationswoche verbraucht (36). Im weiteren Verlauf der Embryogenese wird der Kohlenhydratbedarf über endogene Neusynthese gedeckt (5, 55).

Bis zum 18. Inkubationstag wird allerdings mehr Glucose synthetisiert als verbraucht. Diese wird in Form von

Glykogen, vor allem in der Leber und der Dottersackmembran gespeichert (2) und in der Endphase der Inkubation dem Embryo verfügbar gemacht.

1.2 Sauerstoffversorgung des Embryos

Ähnlich wie beim Säuger erfolgt auch beim Vogel im Verlauf der Ontogenese eine wiederholte Umstellung im Gasaustausch. In den ersten Entwicklungsstadien wird der Embryo über Diffusion mit Sauerstoff versorgt. Mit zunehmendem Wachstum des Embryos steigt dessen Bedarf an Sauerstoff, und die Diffusionsstrecken werden für eine adäquate Versorgung zu lang. Deshalb ist die baldige Ausbildung eines Gefäßsystems für die Aufnahme, den Transport und die Abgabe der Atmungsgase notwendig (29)..

Beim Hühnerembryo treten die ersten Blutinseln und Blutgefäße in der Chorioallantoismembran um den 2. bis 3. Inkubationstag auf und stellen den Kontakt zur Außenwelt her. Die Chorioallantoismembran entspricht hinsichtlich des Gaswechsels der Plazenta der Säugetiere. Das venöse Blut wird über die Arteriae umbilica-

les zur Chorioallantois geführt, wo es arterialisiert wird. Das sauerstoffbeladene Blut sammelt sich in den Nabelvenen. Ein Teil strömt unter kapillarer Auflösung durch die Leber, der andere Teil gelangt als "bypass" über den Ductus venosus in die Vena cava caudalis, wo es sich mit venösem Blut der hinteren Körperhälfte vermischt und zum rechten Vorhof fließt. Wegen des großen Widerstandes im Lungengefäßsystem des Embryos gelangt der größte Teil des Blutes aus der A. pulmonalis über den Ductus arteriosus direkt in die Aorta descendens. Nur ein kleiner Teil gelangt in das Lungengefäßsystem (87).

Bis zum 19. Inkubationstag erfolgt beim Hühnerembryo der Gasaustausch ausschließlich über die Chorioallantoismembran (29). Der zunehmende Sauerstoffbedarf des wachsenden Embryos wird durch eine Steigerung des Chorioallantoisblutflusses, eine Zunahme der Erythrozytenzahl und des Hämoglobingehaltes, sowie durch eine Erhöhung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins gedeckt (32, 84, 96). Für die Steigerung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins ist die Änderung der organischen Phosphatverbindungen der Erythrozyten von großer Bedeutung (6, 8, 48).

Nach 19 Inkubationstagen, ungefähr 24 Stunden vor dem Schlupf, dringt der Hühnerembryo dann mit dem Schnabel in die Luftkammer ein und beginnt mit der Lungenatmung (86). Ab dieser Zeit versiegen die Chorioallantoisgefäße allmählich (100). Nach weiteren 12 Stunden verschafft sich der Embryo durch das Anpicken der Eischale einen direkten Zugang zur Atmosphäre (101). Nun werden die Chorioallantoisgefäße überflüssig und obliterieren.

Der Übergang vom fetalen Gasaustausch über die Plazenta zur Lungenatmung vollzieht sich beim Säuger augenblicklich, beim Vogel jedoch stellt der Übergang von der embryonalen zur Lungenatmung einen langsam fortschreitenden Prozeß dar (102). Dieser Unterschied kommt zustande, da beim Säuger mit dem Reißen der Nabelschnur der fetale Gasaustausch über die Plazenta augenblicklich unterbrochen wird, während beim Vogel die Chorioallantoisatmung auch nach dem Einsetzen der Lungenatmung noch weiterbesteht, wenn auch im geringeren Umfang. Der Vogelembryo atmet also nach dem Eindringen des Schnabels in die Luftkammer eine gewisse Zeit lang sowohl über die Lungen als auch über die Chorioallantoisgefäße. In dieser von Romijn (85) als "parafetal" bezeichneten Phase wird die Lungenatmung immer effek-

tiver, während die Gasaustauschkapazität der Chorionallantoismembran ständig abnimmt.

1.3 Bedeutung der Katecholamine in der pränatalen und perinatalen Phase

Bereits in den Eiern und frühen Teilungsstadien von Avertebraten und Vertebraten sind monoamine Neurotransmitter enthalten (89). Diese sind an den Regulationsmechanismen der frühen Embryogenese beteiligt (89). So modifizieren sie die morphogenetischen Veränderungen der Gastrulation und sind an der Vermittlung von Zellbewegungen, die zur ungestörten Embryogenese notwendig sind, beteiligt (15).

Ignarro und Shideman (45) führten Untersuchungen über das Vorkommen und die Biosynthese von Katecholaminen im Hühnerembryo durch. Sie fanden bemerkenswerte Konzentrationen von Katecholaminen im Dotter von Hühnereiern. Daneben ist der Hühnerembryo in der Lage am ersten Inkubationstag Dopa, am 2. Tag Dopamin, am 4. Tag Noradrenalin und am 6. Tag Adrenalin zu synthetisieren. Das bereits am 3. Inkubationstag im Embryo nachgewiese-

ne Noradrenalin und Adrenalin stammt demzufolge aus den Eivorräten. Das sequentielle Erscheinen der Katecholamine in der Reihenfolge ihrer Syntheseschritte wurde auch an Froschembryonen nachgewiesen (16). Im sich entwickelnden Embryo tragen die im Blut zirkulierenden Katecholamine in erheblichem Ausmaß an der Aufrechterhaltung der metabolischen und cardiovascularen Homöostase bei (19). Darüberhinaus sind diese von großer Bedeutung bei den verschiedensten neonatalen Anpassungsreaktionen: der "non-shivering" Thermogenese, dem Glucose- und Lipidstoffwechsel (7, 31), den Änderungen im Herzkreislaufsystem (33), der Lungenreifung und der Regulierung des Salz- und Wasserhaushaltes (38).

1.4. Entwicklung des Nebennierenmarks

Die in der späteren Entwicklungsphase im Blut zirkulierenden Katecholamine, vor allem das Adrenalin, stammen zum überwiegenden Teil aus dem Nebennierenmark. Ein geringer Teil des Noradrenalingehalts im Plasma stammt aus den Endaufzweigungen der postganglionären adrenergen Nervenendigungen. Die primäre Anlage des Sympathicus entsteht durch Auswanderung von Sympathicoblasten

aus der Neuralleiste. Aus der Anlage des Sympathicus entstehen die spezifischen Zellen der Paraganglien. Diese Zellen bilden Adrenalin und sind sekretorisch tätig. Aus dem Paraganglion suprarenale entwickelt sich dann das Nebennierenmark.

Die Nebenniere der Säugetiere besteht aus zwei Organ- teilen: dem Mark und der Rinde. Diese vereinigen sich im Laufe der Phylogenese. Bei den Fischen liegen beide Organe, das der Nebennierenrinde entsprechende Interrenal-Organ und das dem Nebennierenmark entsprechende Suprarenal-Organ, topographisch noch getrennt vor. Bei den Reptilien und Amphibien lagern sich beide Organe aneinandern, bei den Vögeln durchdringen sie einander. Erst bei den Säugetieren umschließt das Interrenal-Organ das Mark kapselartig. Bei Vögeln und Säugern bildet sich ein Portalkreislauf zwischen Rinde und Mark aus. Das Nebennierenmark entwickelt sich aus ektodermalen Zellen, die vom benachbarten Sympathicus in die mesodermale Rindenanlage einwandern. Daraus differenzieren sich zwei histologisch unterscheidbare Zelltypen, wobei die einen Adrenalin, die anderen Noradrenalin synthetisieren (30, 42). Die Katecholamine werden in Granula der Markzellen gespeichert. Wegen der Anfärbbarkeit

dieser Granula mit Chromsalzen werden die spezifischen Markzellen als "chromaffine Zellen" bezeichnet.

1.5 Synthese und Inaktivierung der Katecholamine

Das in Abb. 1 dargestellte Schema der Katecholamin-Synthese ist seit langem bekannt (10). Sie beginnt mit der Oxidation des Tyrosin zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa), die durch die Tyrosinhydroxylase katalysiert wird. Dieses Enzym ist von besonderer Bedeutung, da es geschwindigkeitsbegrenzend bei der Biosynthese der Katecholamine ist (57). Durch die Decarboxylierung des Dopa mittels der Aromatische-L-Aminosäuredecarboxylase entsteht das Dopamin. Dieses wird durch Hydroxylierung des β -C-Atoms durch die Dopamin- β -hydroxylase zu Noradrenalin umgewandelt. Die Bildung von Adrenalin wird durch die Phenylethanolamin-N-methyltransferase (PNMT), welche die S-Methyl Gruppe von S-Adenosylmethionin zur primären Stickstoffgruppe des Noradrenalin überträgt, katalysiert. Die PNMT kommt bei Säugetieren fast ausschließlich in der Nebenniere vor (65). In Spuren soll sie auch in Herz und Gehirn vorliegen (4, 64, 77). Die Aktivität der PNMT wird durch Glucocorticoide gesteigert.

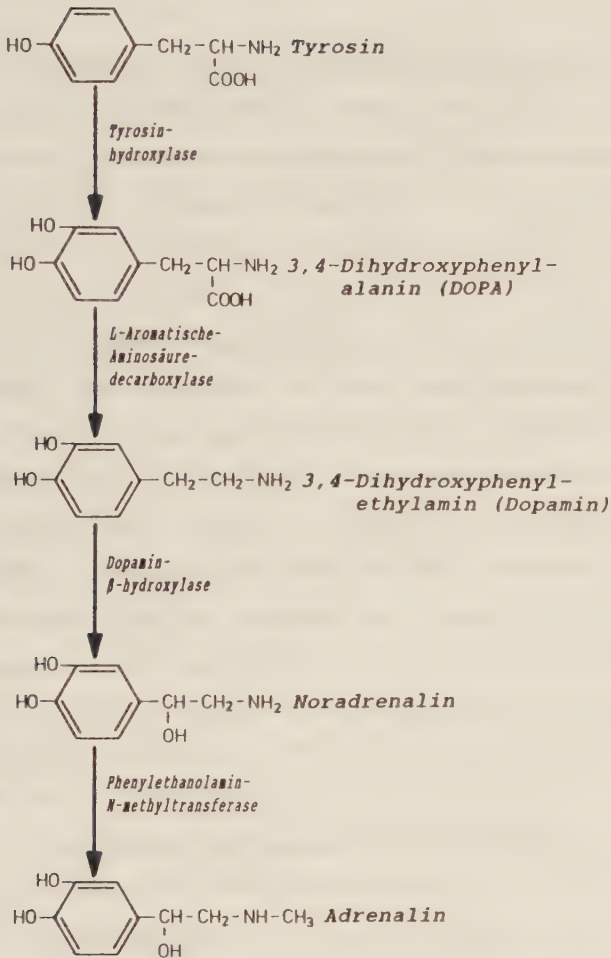


Abb. 1: Synthese der Katecholamine

gert (63). Der rapide Anstieg der Cortisolspiegel vor der Geburt (78, 109) wird deshalb für die parallel hierzu in Erscheinung tretende Steigerung der Adrenalin-synthese und -freisetzung verantwortlich gemacht (19).

Die Inaktivierung der Katecholamine erfolgt durch O-Methylierung (Katechol-O-methyltransferase COMT) und/oder durch oxidative Desaminierung (Monoaminoxidase MAO). Die COMT liegt weit verbreitet in den Geweben von Vertebraten vor (3, 25). Die auch in Avertebraten nachgewiesene MAO kommt vor allem in den Mitochondrien der glandulären Organe, der Nervenzellen im Herzmuskel und in der Leber vor (103). Zirkulierende Katecholamine werden hauptsächlich in der Leber inaktiviert.

1.6 Regulierung der Synthese und Freisetzung

Mehrere Faktoren beeinflussen die Syntheserate der Katecholamine im Nebennierenmark und in den terminalen adrenergen Nervenendigungen (65, 104). Im postnatalen Leben wird die Regulierung der Katecholaminsynthese und -freisetzung vor allem über das sympathische Nerven-

system vermittelt. Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks haben n-Cholinrezeptoren und reagieren auf deren Aktivierung durch Acetylcholin mit der Exocytose der in den Granula gespeicherten biogenen Amine. Die Exocytose kommt durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in den chromaffinen Zellen zustande (27, 28). Auch die Syntheserate der Katecholamine wird durch Nervenstimulierung gesteigert. Diese gesteigerte Syntheserate ergibt sich aus der erhöhten Aktivität der Tyrosinhydroxylase (69). Dies erscheint, zumindestens teilweise, durch die Verminderung der Endprodukthemmung, die Noradrenalin auf die Tyrosinhydroxylase ausübt, hervorgerufen zu sein (47).

Daneben beeinflussen verschiedene Hormone die Katecholaminfreisetzung (35). Angiotensin II, Prolaktin und Vasopressin stimulieren die chromaffinen Zellen zur Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin (24, 39, 75, 88). Im Gegensatz dazu hemmen β -Endorphin und PGE_2 die Katecholamin-Sekretion (19).

Im pränatalen Leben sind die nicht-neuronalen Regulationsmechanismen von großer Bedeutung, solange die vegetative Innervation des NNM noch unvollständig ent-

wickelt ist (21). Der Zeitpunkt der Innervierung des Nebennierenmarks durch die Nn.splanchnici ist tierartlich verschieden (94).

Fetale Hypoxie wirkt besonders stimulierend auf die Katecholaminfreisetzung (51, 58). Die hypoxisch bedingte Aktivierung der chromaffinen Zellen erfolgt auf neuronalem Weg und durch den direkten Einfluß eines verminderten arteriellen PO_2 (22). Außerdem bewirkt Hypoxie eine Vasopressinausschüttung (24, 95), was wiederum zu einer Steigerung der Katecholaminexkretion führt. Auch die direkte Wirkung von Hypoxie auf die Katecholaminfreisetzung kommt durch eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zustande (91). Es ist jedoch unklar, auf welche Weise dies geschieht. In der Literatur wird die Möglichkeit einer durch niedrige O_2 -Spannung verursachten Beeinflussung von Ionenkanälen der Zellmembran (91), aber auch eine intrazelläre Ca^{2+} -Freisetzung aus den Mitochondrien (41) diskutiert.

1.7 Adrenozeptoren

Adrenalin und Noradrenalin lösen ihre Wirkung über die

Stimulierung von Rezeptoren aus. Die Rezeptoren befinden sich an der Zytoplasmamembran der Zielzellen. Die Unterteilung der Rezeptoren in 2 Typen wurde von Ahlquist (1) vorgeschlagen. Er führte Versuche mit 6 chemisch unterschiedlichen sympathomimetischen Aminen an verschiedenen Geweben durch. Aufgrund der zum Teil konträren Wirkungen (Kontraktion, Erschlaffung) der verschiedenen Amine, postulierte er die Existenz von 2 Rezeptortypen, die nicht, wie früher vorgeschlagen (17), in "inhibitorisch" und "exzitatorisch" einzuordnen waren. Stattdessen bezeichnete er sie als α - bzw. β -Rezeptoren. Die nach der Entdeckung des β -Blockers Dichlorisoproterenol (93) durchgeführten Untersuchungen verhalfen Ahlquists Einteilung der Adrenozeptoren zur allgemeinen Anerkennung. Die Entdeckung neuer Adrenozeptor-Agonisten bzw. Antagonisten (67) führte zu einer weiteren Unterteilung in " α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 -Adrenozeptoren".

Die natürlich vorkommenden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin verfügen sowohl über α -, als auch β -agonistische Wirkung. Adrenalin hat eine hohe Affinität zu den 4 oben erwähnten Rezeptorensubtypen. In niedrigen Dosen überwiegen die β -mimetischen Wirkungen, in hohen

Dosen treten die α -mimetischen Wirkungen in den Vordergrund. Bei Noradrenalin überwiegt die α -mimetische Wirkungskomponente. Es stimuliert aber auch die β_1 -Rezeptoren. Dopamin entfaltet eine direkte, periphere Wirkung über Dopamin-Rezeptoren, die sich in den Splanchnicus- und Nierengefäßen befinden.

Neben den natürlichen Katecholaminen stehen synthetische Verbindungen mit agonistischer und antagonistischer Adrenozeptorenwirkung zur Verfügung. Die direkt wirkenden Adrenomimetika sind meist Derivate des Phenylethanolamin. Mit zunehmender Größe des Substituenten an der Aminogruppe nimmt die relative Affinität zu den α -Rezeptoren ab, die zu den β -Rezeptoren zu. Nach Substitution eines Methylrests entsteht das α -Mimetikum Phenylephrin, nach Substitution eines Isopropylrests das β -Mimetikum Isoproterenol. Bei den Adrenozeptorblockern handelt es sich um Verbindungen mit hoher Affinität zum Rezeptor bei fehlender oder geringer agonistischer Aktivität.

Die Bindung eines Adrenomimetikums an den entsprechenden Rezeptor führt zur Auslösung einer Reaktionskaskade. Die Wirkung kommt in den meisten Fällen letztlich

durch eine Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes zustande.

Durch die Erregung eines α -Rezeptors wird die Ca^{2+} -Konzentration der betreffenden Zelle erhöht. Bei der α_1 -Wirkung kommt es über die Aktivierung einer Enzymkaskade zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum. Die Aktivierung von α_2 -Rezeptoren hat einen erhöhten Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol zur Folge.

β -Agonisten aktivieren die intrazelluläre Bildung von 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP). Dieses führt inaktive Proteinkinasen in ihre aktive Form über, die ihrerseits durch Phosphorylierung inaktive Enzyme in die aktive Form überführen. Die Phosphorylierung von Kanalproteinen der Zellmembran führt an Zellen mit β_1 -Rezeptoren (Herzmuskel) zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Influx. Nach Aktivierung von β_2 -Rezeptoren nimmt der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt ab.

1.8 Wirkung der Katecholamine auf das cardiovascular System

Am Herzen wirken Adrenalin und Noradrenalin gleichsinnig: Die Schlagfrequenz, die Kontraktionskraft und die Reizleitungsgeschwindigkeit nehmen zu (positiv chronotrop, positiv inotrop, positiv dromotrop). Diese, durch Katecholamine hervorgerufenen Reaktionen werden durch β -Blocker antagonisiert (66, 67). Dagegen heben α -Blocker die adrenergen Herzwirkungen nicht auf (68, 70). Mit Hilfe des selektiven β_1 -Blockers Practolol und der Anwendung des β_2 -Mimetikums Salbutamol (13) wurden die Adrenozeptoren des Herzens dem β_1 -Subtyp zugeordnet.

Die sympathische Regulierung des Gefäßtonus erfolgt über α - und β_2 -Rezeptoren. Die Stimulierung der α -Rezeptoren führt zur Vasoconstriction, die der β -Rezeptoren zur Vasodilatation. β_2 -Rezeptoren befinden sich vor allem an den Arteriolen der Skelettmuskulatur. Adrenalin und Noradrenalin bewirken eine Konstriktion der Lungengefäße, die durch α -Blocker zu antagonisieren ist (49). In anderen Untersuchungen wurde eine Erweiterung der Lungengefäße nach Isoproteronolverabreichung ge-

messen (18). An den Bronchialsphinkteren befinden sich β_2 -Rezeptoren, deren Stimulierung eine Erschlaffung der glatten Muskulatur und damit eine Dilatation der Bronchien vermittelt.

1.9 Wirkung der Katecholamine auf den Kohlenhydratstoffwechsel

Katecholamine greifen an mehreren Stellen in den Kohlenhydratstoffwechsel ein. Sie stimulieren die Glykogenolyse und die Gluconeogenese. Die Glykogenolyse wird sowohl durch α - als auch durch β -Mimetika induziert. Allerdings bestehen in der glykogenolytischen Wirksamkeit von α -, bzw. β -Agonisten erhebliche tierartliche Unterschiede (105).

Die glykogenolytische β -Wirkung erfolgt über eine Kaskade von Enzymaktivierungen, wobei letztlich die inaktive Phosphorylase b in die aktive Phosphorylase a übergeführt wird. Durch den α -mimetisch vermittelten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration entsteht in der Leberzelle Calmodulin das wiederum die Phosphorylase b aktiviert.

Darüberhinaus greifen die Katecholamine in die Regulierung der Insulinfreisetzung aus den B-Zellen des Pankreas ein. Dabei wird die Insulinausschüttung durch α -Agonisten inhibiert und durch β -Agonisten gefördert (81). Schließlich wirken α -Mimetika über eine Verminderung der Leberdurchblutung (72) indirekt synergistisch auf die Glykogenolyse.

1.10 Zielsetzung

Wie aus der Einleitung hervorgeht, kommt den Katecholaminen in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der metabolischen und kardiovaskulären Homöostase zu. Diese Erkenntnisse wurden bisher fast ausschließlich am Säuger gewonnen. Demgegenüber liegen vom Vogelembryo keine umfassenden systematischen Arbeiten vor. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, daß sich die Analyse der Katecholamine früher als äußerst problematisch darstellte. Beim Vogel kommt hinzu, daß die Probemengen nicht sehr groß sind. Mit der Entwicklung der HPLC-Detektion wurde aber eine neue Möglichkeit geschaffen, Katecholamine auch in kleinen Blutmengen reproduzierbar zu bestimmen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher Dopamine, Noradrenalin und Adrenalin im Plasma von Hühnerembryonen zu bestimmen. Dabei wurde die spätembryonale Phase gewählt, weil in dieser Phase Prozesse ablaufen, die unter dem Einfluß der Katecholamine stehen: Die Ausbildung der Lungenatmung, kardiovaskuläre und metabolische Veränderungen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden mit Embryonen der Rasse "Weißes Leghorn" durchgeführt. Die Eier wurden vom Gut Heinrichsruh (Langenbach Obb.) bezogen und im Inkubator bei $37,5 \pm 0,5^\circ$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 63 - 67 % bebrütet.

2.2 Reagentien

Die Reagentien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Die Enzyme und Coenzyme sowie die Testkombination zur Bestimmung von 2,3-DPG: Fa. Boehringer, Mannheim.

EGTA und EDTA: Fa. Serva Heidelberg.

Tetraoctylammoniumbromid und Octansulfonsäure: Fa. Aldrich-Chemie, Steinheim.

Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Dihydroxybenzylamin, Isoproteronol, Phenylephrin, Propranolol, Diphenylbor-säure: Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen.

Phenoxybenzamin: Fa. Röhm Pharma, Weiterstadt.

Stickstoff-Sauerstoff-Gemisch (90% N_2 , 10% O_2): Fa. Linde, Lohhof b. München.

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck AG, Darmstadt bezogen.

2.3 Bestimmung der Plasmakatecholamine

2.3.1 Plasmagewinnung

Das Blut wurde durch Herzpunktion gewonnen. Es wurde direkt in mit EGTA beschichtete Zentrifugenröhrchen, die in einem Eisbad standen, übergeführt. Durch 5-minütiges Zentrifugieren bei $4^{\circ}C$ und $1500 \times g$ wurde das Plasma gewonnen. Dieses wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße übergeführt und bei $-68^{\circ}C$ tiefgefroren. Bei diesen Temperaturen war innerhalb von 6 Wochen keine Abnahme des Plasmakatecholamingehaltes nachzuweisen.

2.3.2 Extraktion der Katecholamine

Der Bestimmung der Katecholamine über die HPLC-Auftrennung wurde ein Reinigungsschritt vorangestellt.

Die Reinigung erfolgte nach einer Modifikation der von Nissen et.al. (71) vorgestellten Extraktionstechnik mit Diphenylborsäure.

Die Reaktionsgefäße wurden zwischen den verschiedenen Arbeitsgängen in Eiswasser gestellt. Die aufgetauten Proben wurden bei 4°C und 6000 x g zentrifugiert. Dann wurden 200 µl Plasma mit 100 µl des inneren Standards (50 ng Dihydroxybenzomin in 1 ml 0,1 n Essigsäure), 1 ml eines 2 molaren $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$ -Puffers (pH 8,5), der 0,2% Diphenylborsäure und 0,5% EDTA enthielt, und 5 ml eines Gemisches aus n-Heptan/Chloroform (75/25; V/V), dem 0,25% Tetraoctylammoniumbromid zugesetzt waren, versetzt. Die Röhrchen wurden intensiv gemischt und zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und mit 2 ml n-Octanol und 200 µl 0,1 n Essigsäure versetzt. Anschließend wurde wiederum intensiv geschüttelt und zentrifugiert. 50 µl der wäßrigen Phase wurden dann in das HPLC-System injiziert. Die zur Reinigung und zum Nachweis der Katecholamine verwendeten Lösungen wurden mit entionisiertem, anschließend destilliertem Wasser, das zudem noch Millipore filtriert wurde, hergestellt.

2.3.3 Das HPLC-System

Die Katecholamine wurden mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie identifiziert und quantifiziert. Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe (Modell 114 M Beckmann), einem Einspritzsystem (Modell 340 Beckmann) mit 50 µl Schleife und einer Säule (250 x 4,6 mm Spherisorb ODS-II, 5 µm). Zur Detektion wurde ein Volt-Ampère Detektor (Modell 641 Metrohm AG) und eine elektrochemische Detektorzelle (Modell 656 Methrohm AG) mit "Glassy-Carbon-Electrode" als Arbeitselektrode verwendet.

2.3.4 Chromatographische Bedingungen

Die mobile Phase bestand aus einer 0,02 molaren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lösung, die 1 mmol/l EDTA und 2,5 mmol/l Octansulfonsäure enthielt und mit Eisessig auf pH3 eingestellt wurde und dem Eluenten (108,5 ml Acetonitril/1). Die mobile Phase wurde durch Einleitung von Helium entgast. Die Flußrate betrug 1,1 ml/min. Die Detektion erfolgte amperometrisch im Meßbereich von 5 nA. Die Arbeitsspannung betrug 800 mV.

2.3.5 Identifizierung und Quantifizierung der Katecholamine

Zur Aufzeichnung der Peaks und zur Integration der Peakflächen stand ein Integrator (Shimadzu CR 3A) zur Verfügung. Zur Identifizierung der Peaks wurden unter denselben chromatographischen Bedingungen die Standardlösungen aufgegeben und ihre Retentionszeiten mit den Retentionszeiten der im Chromatogramm der Plasmaprobe erhaltenen Peaks verglichen. Die Retentionszeit einer Verbindung hängt bei der Verwendung von Umkehrphasensäulen maßgeblich von ihrer Polarität ab. Unpolare, ungeladene Verbindungen werden länger an der stationären Phase zurückgehalten und erscheinen später im Eluat.

Die Quantifizierung der Katecholamine erfolgte über den Vergleich zweier Quotienten. Der eine Quotient wurde aus der Peakfläche der Probe und der Peakfläche des der Probe zugegebenen internen Standards (Dihydroxybenzylamin, DHBA) gebildet, der andere aus der Peakfläche der Standardlösung und der Peakfläche des internen Standards. Das Chromatogramm des Plasmas eines 18 Tage alten Hühnerembryos ist in Abb. 2 dargestellt.



Abb. 2: Chromatogramm des Plasmas eines 18 Tage alten Hühnerembryos.

2.3.6 Prinzip der elektrochemischen (amperometrischen) Detektion

Die Elektrochemie läßt sich für den spezifischen Spurennachweis von leicht oxidierbaren oder reduzierbaren organischen Verbindungen nutzen. Die Nachweisgrenze liegt in günstigen Fällen bei 0,1 Picomol.

Die Detektorzelle, in welcher die elektrochemische Reaktion abläuft, besitzt drei Elektroden. Zwischen Arbeits- und Referenzelektrode liegt ein wählbares Potential, durch welches es zu einer elektrochemischen Reaktion, im Fall der Katecholamine zur Oxidation einer aromatischen Hydroxiverbindung, kommt. Der durch die Oxidation entstehende Strom wird über die Hilfselektrode abgeleitet, so daß er das Potential der Arbeitselektrode nicht beeinflussen kann. Er ist in einem weiten Bereich der Stoffkonzentration proportional und wird mit einem angeschlossenen VA-Detektor gemessen, verstärkt und als Funktion der Zeit in einem sogenannten Chromatogramm aufgezeichnet.

2.3.7 Prüfung der methodischen Bedingungen

Zur Prüfung der Linearität wurden Standardlösungen der gemessenen Katecholamine in 6 verschiedenen Konzentrationen, von 12,5 ng/ml bis 400 ng/ml, denen 50 ng/ml DHBA als interner Standard zugegeben war, gemessen. Die Korrelationskoeffizienten der berechneten Regressionsgeraden zwischen der Konzentration und dem Quotienten aus Peakfläche der Standardlösungen und Peakfläche des internen Standards lagen über 0,99.

Die Richtigkeit der Bestimmungen wurde mit Hilfe der Wiederfindung eines bekannten Standardzusatzes (50 ng/ml) zum Plasma und die Präzision durch Mehrfachbestimmung derselben Probe beurteilt (Tab. 1) Die Präzision ist in Prozent der Standardabweichung der Stichprobe vom Mittelwert (Variationskoeffizient, VK) angegeben.

Tab. 1: Wiederfindungsrate und Präzision der Katecholaminbestimmung

Anzahl der Bestimmungen: $n = 8$

	Wiederfindung	Präzision (VK)
Noradrenalin	98,5 %	3,2 %
Adrenalin	96,3 %	4,1 %
DHBA	82,1 %	5,6 %
Dopamin	88,5 %	9,8 %

2.4 Applikation der Substanzen

Die zu applizierenden Substanzen wurden in 0,01 molarer HCl aufgelöst und anschließend mit aqua bidest 1 : 100 verdünnt, so daß der Wirkstoff in 2,5 m-molarer Lösung vorlag. 100 µl dieser Lösung wurden den Embryonen verabreicht. Den Kontrollen wurden 100 µl des Lösungsmittels appliziert. Dazu wurde die Eischale am stumpfen

Pol mit einer auf eine 1 ml Injektionsspritze aufgesetzten Kanüle durchstoßen und die Lösung in die Luftkammer appliziert. Das Loch in der Eischale wurde mit Klebstoff (Uhu [®]) verschlossen. Zur Verbesserung der Resorption der Substanzen durch die Chorioallantoisgefäße wurden die Eier auf die Spitze gestellt. Diese Methode hatte sich in früher durchgeführten Versuchen bewährt (107).

2.5 Bestimmung des Glykogens in der Leber

Das Leberglykogen wurde nach dessen Hydrolyse als Glucose bestimmt. Zur Gewinnung der Leber wurden die Embryonen ca. 3 Stunden nach Applikation der Substanzen aus dem Ei genommen und dekapitiert. Die Leber wurde entnommen und 400 mg davon in 1 ml 30 %ige KOH gegeben und homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenglas mit einer 10 ml Eichmarke gegeben und 15 min in siedendem Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden 3,5 ml Äthanol zugegeben, kurz aufgekocht, auf Raumtemperatur abgekühlt und zentrifugiert. Der Niederschlag, der das Glykogen enthielt, wurde mit Äthanol gewaschen und anschließend der verbliebene Äthanolrest im siedenden Wasserbad abgetrieben.

Durch zweistündiges Kochen des Rückstandes in 2 molarer H_2SO_4 wurde Glykogen zu Glucose hydrolysiert. Die Lösung wurde mit 2 molarer NaOH neutralisiert und mit aqua bidest auf 10 ml aufgefüllt. 50 μ l dieser Lösung wurden zur quantitativen Bestimmung der Glucose eingesetzt.

2.6 Bestimmung von Glucose, Lactat und 2,3-DPG im Blut

Die Blutentnahme erfolgte ca. 3 Stunden nach dem Applizieren der Substanzen. Das Blut wurde durch Herzpunktion gewonnen und in eisgekühlten, heparinisierten Gläsern aufgefangen. Zur Enteiweißung wurden 200 μ l Blut in 200 μ l gekühlte, 0,6 molare Perchlorsäure pipettiert. Das Gemisch wurde bei 6000 x g zentrifugiert, 300 μ l des klaren Überstandes entnommen und mit 50 μ l 2,5 molarer Kaliumcarbonat-Lösung neutralisiert. Der Perchlorat-Niederschlag wurde abzentrifugiert. Im Überstand wurden Glucose, Lactat und 2,3-DPG photometrisch bestimmt. Als Meßgröße diente NADPH bzw NADH.

2.7 Inkubation bei vermindertem pO_2

Die Inkubation bei vermindertem pO_2 wurde in einem gasdicht verschließbaren Plexiglasbehälter durchgeführt. Der Behälter wurde in einen Brutschrank gestellt. Das Gasgemisch (10 % O_2 , 90 % N_2) wurde aus einer Flüssiggasflasche über einen Schlauch in eine im Brutschrank stehende Wasserflasche geleitet. Das durch das Durchperlen des Wassers erwärmte und angefeuchtete Atemgas strömte während der gesamten Versuchsdauer in den verschlossenen Plexiglasbehälter.

2.8 Bestimmungen der Blutgase

Zur Bestimmung der Blutgase war die Gewinnung von oxigeniertem Blut notwendig. Dazu wurde, 15 - 30 min nach Applikation der Substanzen, am spitzen Pol des Eies ein ca. 1.5 cm x 1.5 cm großes Stück der Eischale entfernt. Die darunter liegende Eihaut wurde abgezogen und die Chorioallantoismembran unter Schonung größerer Gefäße eröffnet. Nach dem Freilegen der V. umbilicalis wurde diese mit einer Gefäßklemme erfaßt und gestaut. Mit einer, auf eine 1 ml Spritze aufgesetzten, heparinisierten,

ten Kanüle wurden ca. 200 μ l Blut entnommen und 100 μ l davon in eine an beiden Enden verschließbare Kapillare übergeführt. Aus der Kapillare wurde das Blut in den Blutgasanalysator gegeben.

Die Messungen wurden mit einem pH-Blutgasanalysator System 1302 der Fa. Instrumentation Laboratory Bernheim, in der I. Medizinischen Tierklinik, durchgeführt. Der IL 1302 arbeitet mit 3 Elektroden zur quantitativen Bestimmung des pH, $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ in Vollblutproben. Aus den Meßwerten und dem Hämoglobingehalt berechnet das Gerät das Plasmabicarbonat, Basenexzeß, CO_2 -Gehalt, Standardbicarbonat und Standard-Basenabweichung. Außerdem wird die O_2 -Sättigung des Hämoglobin wiedergegeben. Sie gibt, unter Berücksichtigung des pH und des $p\text{CO}_2$, den Anteil des oxigenierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin in Prozent an.

2.9 Bestimmung des Hämoglobingehalts der Chorionallantoismembran, der Lunge und der Niere.

Zur Gewinnung der Proben wurden die Embryonen aus der Eischale genommen, durch Dekapitation getötet und die

entsprechenden Organe entnommen. Lunge und Niere wurden in je 1 ml, die Chorioallantoismembran in 2 ml aqua bidest gegeben und homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 6000 x g zentrifugiert und aus dem Überstand das Hämoglobin und als Referenzgröße der Proteingehalt quantitativ bestimmt.

Die Hämoglobinbestimmung wurde nach der Cyan-Hämiglobinmethode durchgeführt (9).

Die Hämoglobinreagenzlösung besteht aus:

Kaliumhexacyanoferrat	: 0,6 mmol/l
Kaliumcyanid	: 0,7 mmol/l
Kaliumdihydrogenphosphat	: 1,0 mmol/l
Triton X-100	: 1 %

Zu 2,5 ml dieser Reagenzlösung wurde 0,1 ml Probe zugegeben. Die in der Probe vorhandenen Hämoglobinverbindungen wurden durch Kaliumcyanid und Kaliumhexacyanoferrat in Hämiglobincyanid übergeführt. Die Farbintensität des gebildeten Hämiglobincyanids ist der Hämoglobinkonzentration proportional und wird bei 546 nm nach etwa 5 Minuten gemessen.

2.10 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Enzymproben wurde nach einer modifizierten Biuret-Methode (37) durchgeführt. Als Standard wurde bovines Serumalbumin verwendet.

2.11 Blutflußmessung beim Hühnerembryo

Das hier angewendete Verfahren beruht auf dem Faraday-schen Induktionsgesetz (26): Bewegt man einen elektrischen Leiter in einem Magnetfeld, so entsteht im Leiter ein elektrischer Strom. Dieses Gesetz gilt analog auch für elektrisch leitende Flüssigkeiten wie Kochsalzlösungen oder Blut. Das Magnetfeld wird von einem sich im Meßkopf befindenden Elektromagneten, zwischen dessen Polen das Gefäß liegt, aufgebaut. Der Bewegung des metallischen Leiters entspricht hierbei die Strömung der in der Flüssigkeit gelösten und dissoziierten Moleküle. Die Ionen werden gemäß ihrer Ladung senkrecht zum magnetischen Feld separiert. Die elektrischen Ladungen der nach Polarität getrennten Ionen werden von zwei orthogonal zum bestehenden Magnetfeld angeordneten Elektroden, die mit dem Gefäß in Kontakt stehen, neutrali-

siert. Die beiden Elektroden sind in einem Stromkreis verbunden. Der durch die Ionenbewegung im Blut induzierte Strom ist der Anzahl der den Meßkopf durchfließenden Ionen und somit der Blutmenge proportional.

Die Blutflußmessung wurde mit einem elektromagnetischen Flowmeter (Narcomatic RT-500 der Fa. Hugo Sachs Elektronik KG, March Hugstetten) durchgeführt. Dazu wurde ein Ast der A. umbilicalis in der in Abschnitt "Blutgasbestimmung" beschriebenen Weise freipräpariert. Das freigelegte Gefäß wurde in einen Meßkopf von 0,5 mm Durchmesser gelegt. Nach einer 2-Punkt-Eichung konnte der Blutfluß (ml/min) direkt am Gerät abgelesen bzw. auf einen Integrationsschreiber übertragen werden.

Zur Eichung wurde der Meßkopf in 0,9 %ige NaCl Lösung gegeben und zunächst auf "0" justiert. Nach Einstellung eines Kalibrierungsfaktors (7 ml/min für 0,5 mm Meßkopf) am Gerät wurde die Anzeige auf den Wert des eingestellten Kalibrierungsfaktors gebracht.

Die Lösungen der Substanzen, deren Einfluß auf den Blutfluß zu prüfen war, wurden auf die freigelegte Eihaut, unter welcher sich die Chorioallantoismembran be-

findet, aufgetropft. Das Ei befand sich während der Messung in einem auf 37°C aufgeheizten Brutschrank.

2.12 Statistische Auswertung

Die in den Tabellen angegebenen Werte stellen Mittelwerte dar. Zusätzlich wird die Standardabweichung angegeben. Für die Statistische Auswertung wurde das Programm SPSS/PC+ (73) eingesetzt. Beim Vergleich zweier Mittelwerte miteinander wurde der t-Test angesetzt, bei mehr als zwei Mittelwerten einfache Varianzanalyse (Prozedur ONE WAY).

3. ERGEBNISSE

3.1 Bestimmung der Plasmakatecholaminkonzentration in der spätembryonalen Entwicklungsphase

3.1.1 Einteilung in Entwicklungsstadien

Für die Untersuchungen war die Höhe der Katecholaminkonzentration zu verschiedenen Entwicklungsstadien von Interesse. Besonders wichtig war dabei der Zeitpunkt der Auslösung der Lungenatmung. Mit Hilfe der Schwimmprobe wurde daher ermittelt, ob die Lungen beatmet waren. Bei den vorliegenden Untersuchungen waren die Embryonen in der Regel nach 19 Bebrütungstagen noch nicht mit dem Schnabel in die Luftkammer eingedrungen; die Lungenschwimmprobe war negativ. Nach einer Bebrütungszeit von 19 $\frac{1}{2}$ Tagen war der überwiegende Teil der Embryonen mit dem Schnabel in die Luftkammer eingedrungen; die Schwimmprobe war bei der Mehrzahl dieser Tiere positiv. Das Anpicken der Fischale erfolgte meist nach 20 Inkubationstagen.

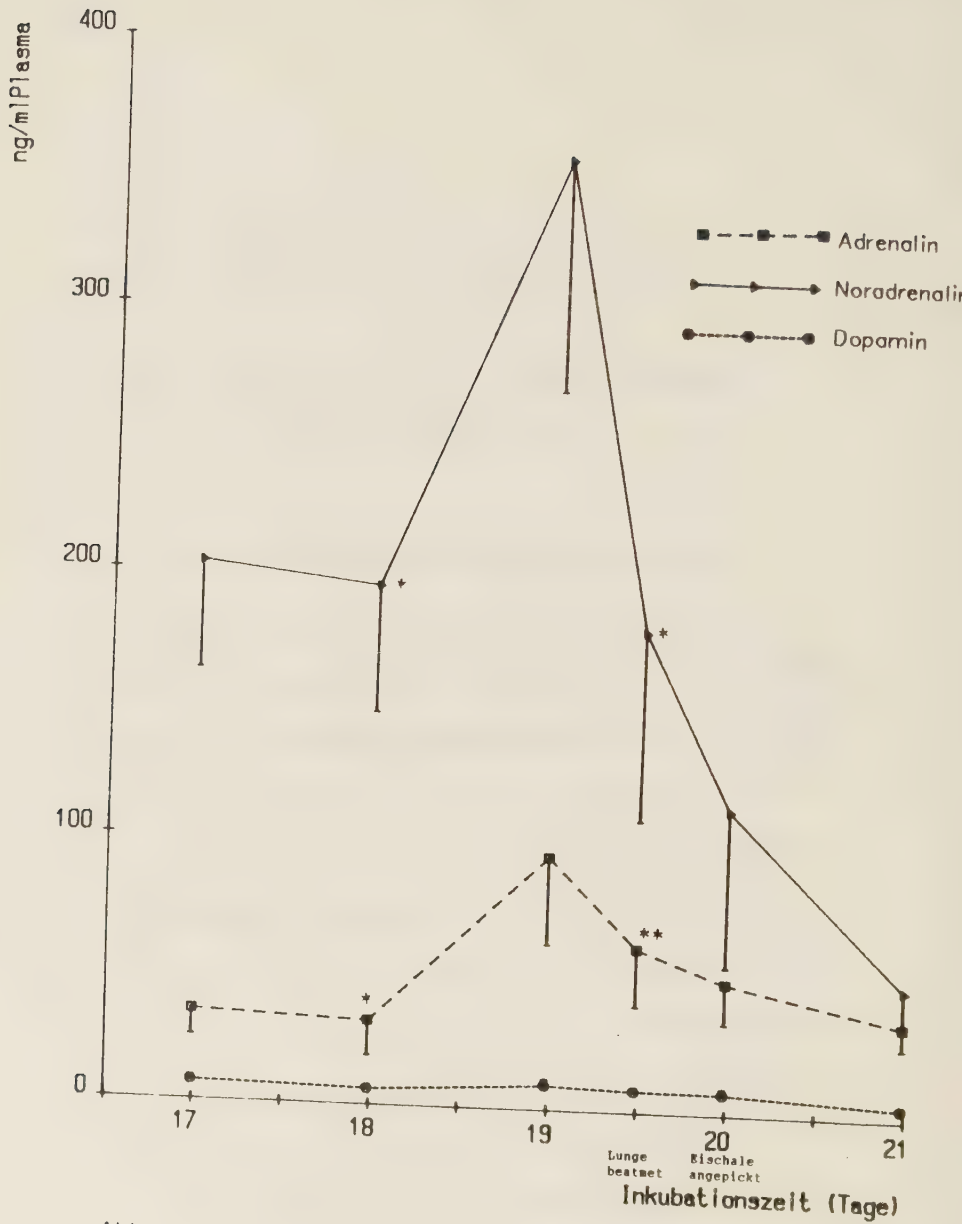


Abb. 3: Verlauf der Plasmakatecholaminkonzentration

* $p < 0,001$

** $p < 0,05$ im Vergleich zum 19. Inkubationstag

$n = 12$

3.1.2. Plasmakatecholaminkonzentration in verschiedenen Entwicklungsstadien

Wie Abb. 3 zeigt, blieben die Plasmakatecholaminkonzentrationen vom 17. zum 18. Bebrütungstag annähernd konstant. Am 19. Bebrütungstag - vor dem Beginn der Lungenatmung - erreichten sie ein Maximum. Nach dem Beginn der Lungenatmung fiel die Plasmakonzentration der Katecholamine, vor allem die des Noradrenalin signifikant ab.

Etwa 24 Stunden nach Erreichen des Maximums, das für Noradrenalin bei 356,6 ng/ml und für Adrenalin bei 94,8 ng/ml lag, sanken die Katecholaminspiegel auf 114,2 ng/ml, bzw. 49,3 ng/ml. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die Embryonen durch Anpicken der Eischale bereits einen direkten Zugang zur Atmosphäre geschaffen.

Im Plasma geschlüpfter Küken wurde ein, im Vergleich zum 20. Bebrütungstag um mehr als die Hälfte, auf 48,6 ng/ml, verminderter Noradrenalingehalt gemessen, während sich der Adrenalingehalt, auf 35,1 ng/ml verringerte.

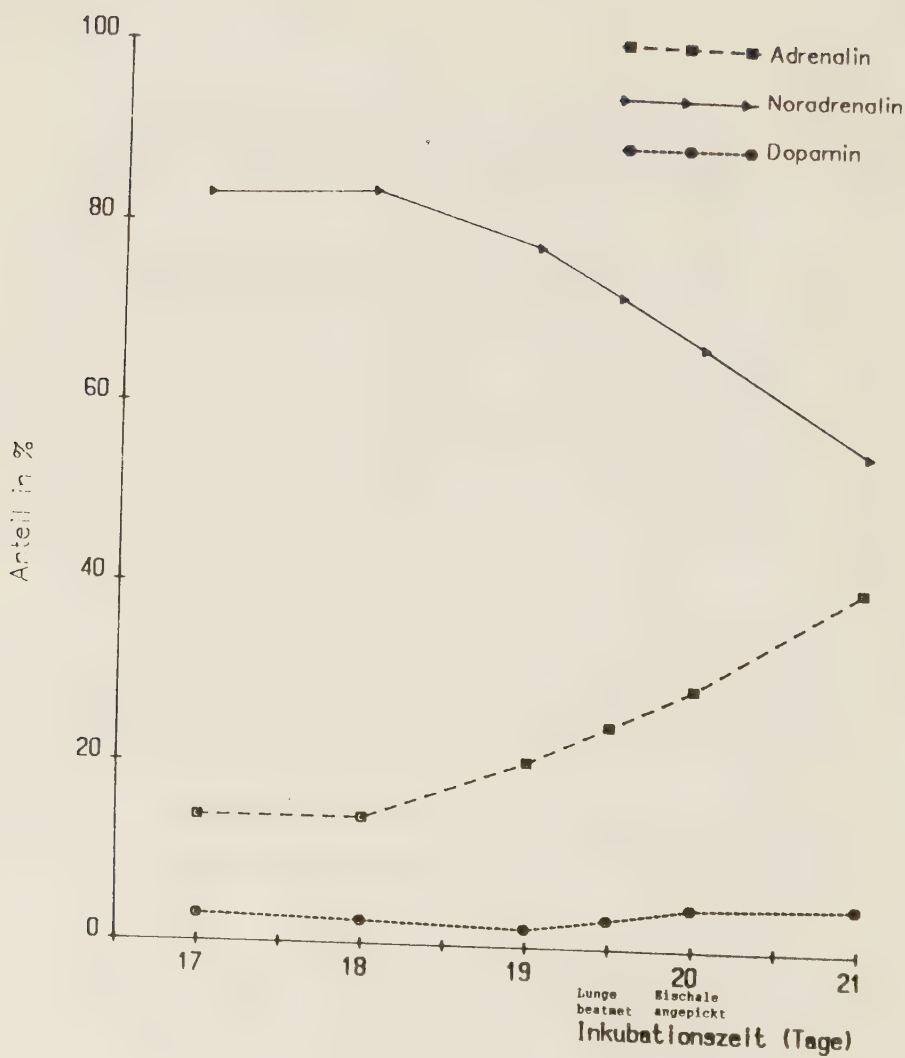


Abb. 4: Prozentuale Verteilung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin

3.1.3. Verlauf der anteilmäßigen Verteilung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin am Gesamtkatecholamingehalt

Zur Ermittlung der in Abb. 4 wiedergegebenen Daten wurde die Summe der Mittelwerte der Plasmagehalte von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin (ng/ml) an den jeweiligen Bebrütungstagen als 100 % angenommen und daraus der prozentuale Anteil der verschiedenen Katecholamine bestimmt.

Vom 17. zum 18. Bebrütungstag veränderte sich die anteilmäßige Verteilung der einzelnen Katecholamine kaum. Vom 18. zum 21. Bebrütungstag jedoch verdreifachte sich der Adrenalinanteil in annähernd linearem Verlauf von 13,6 % auf 39,8 %. Der Dopaminanteil verdoppelte sich von 2,6 % auf 5,4 %, und der Noradrenalinanteil ging von 83,8 % auf 55,1 % zurück.

Tabelle 2:

Katecholaminkonzentration am 18. Bebrütungstag nach zweistündiger Inkubation mit 10 % O₂ und 90 % N₂.

ng/ml Plasma		
Katecholamin	Kontrolle (Luft)	10% O ₂ 90% N ₂
Adrenalin	31,5 ± 13,2 n = 12	228,5 ± 56,5 * n = 11
Noradrenalin	195,2 ± 47,7 n = 12	701,6 ± 126,0* n = 11
Dopamin	5,93 ± 1,17 n = 12	27,3 ± 5,5 * n = 11

n= Anzahl der untersuchten Embryonen

* p < 0,001 im Vergleich zu den Kontrollen.

3.1.4 Einfluß von Hypoxie auf die Plasmakatecholamin- konzentration

Wie Abb. 3 zeigt, fielen die Plasmagehalte von Adrenalin und Noradrenalin deutlich ab, wenn sich die Sauerstoffversorgung durch das Einsetzen der Lungenatmung verbesserte. Ob umgekehrt Sauerstoffmangel zu einer Erhöhung der Katecholaminspiegel führt, sollte im folgenden Versuch ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden die Plasmakatecholamine von Embryonen bestimmt, die unmittelbar vor der Blutentnahme für die Dauer von 2 h in einem hypoxischen Gasgemisch inkubiert waren. Die Ergebnisse dieses Versuchs, der am 18. Bebrütungstag durchgeführt wurde, sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Während dieser zweistündigen O_2 -Minderversorgung, stiegen die Plasmakatecholamine signifikant an. Die Noradrenalin-konzentration hatte sich um das $3\frac{1}{2}$ -fache, die Adrenalin-konzentration um das 7-fache und die Dopamin-konzentration um das $4\frac{1}{2}$ -fache erhöht.

3.2 *Einfluß von adrenerg wirksamen Substanzen und von Hypoxie auf den Kohlenhydratstoffwechsel*

Es ist eine lange bekannte Tatsache, daß Katecholamine stimulierend auf den Kohlenhydratstoffwechsel einwirken. Im folgenden wurde daher der Frage nachgegangen, ob die eingangs festgestellten Veränderungen der Katecholaminspiegel Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel zur Folge haben. Dazu wurden der Glykogengehalt der Leber und die Lactat- und Glucosespiegel im Serum, sowie deren Beeinflußbarkeit durch exogene adrenerge Substanzen gemessen.

Den zeitlichen Verlauf der Leberglykogenkonzentration vom 17. zum 21. Bebrütungstag gibt Abb. 5 wieder. Die höchste Glykogenkonzentration in der Leber wurde am 18. Bebrütungstag, mit 113,2 mmol Glucose/kg Leberfrischgewicht gefunden. Mit dem Ansteigen der Plasmakatecholamine vom 18. zum 19. Bebrütungstag, nahm die Glykogenkonzentration der Leber deutlich ab. Dieser Abfall setzte sich bis zur Auslösung der Lungenatmung fort. Danach verlangsamte sich der Nettoabbau von Glykogen.

Die Veränderung des Leberglykogengehalts am 18. Bebrü-

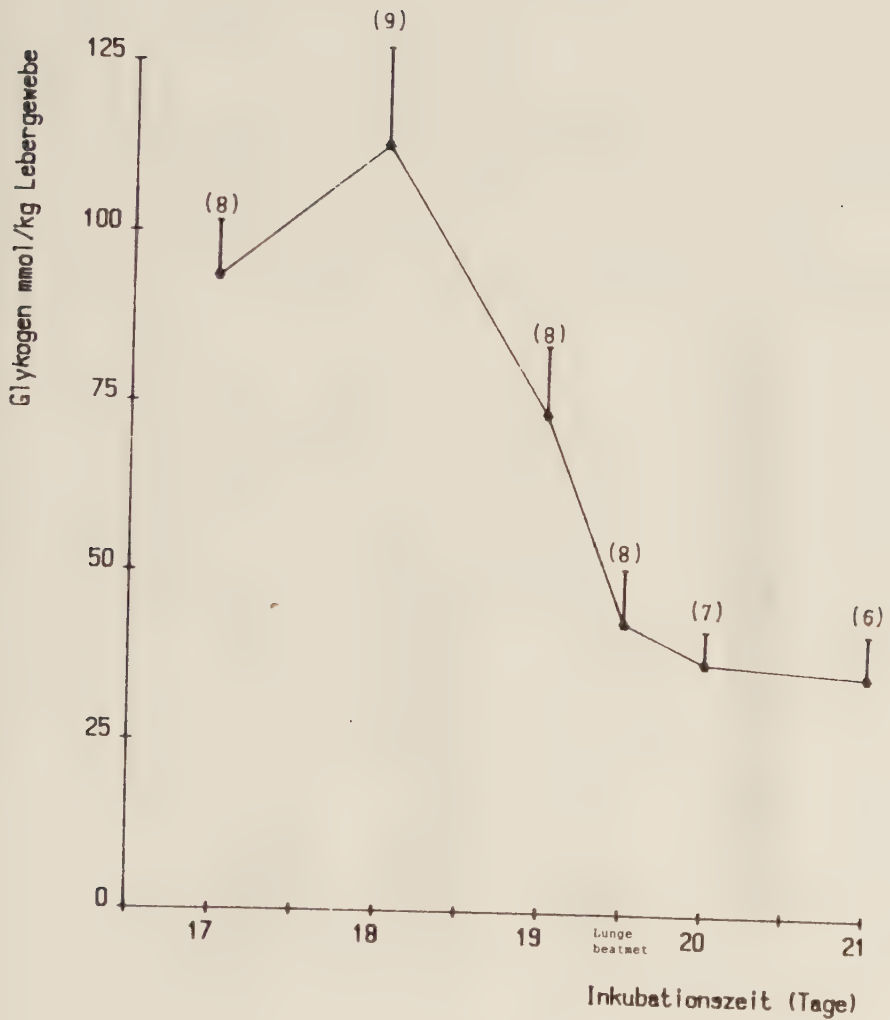


Abb. 5: Verlauf der Leberglykogen-Konzentration
(gemessen in mmol Glucose pro kg Lebergewebe)

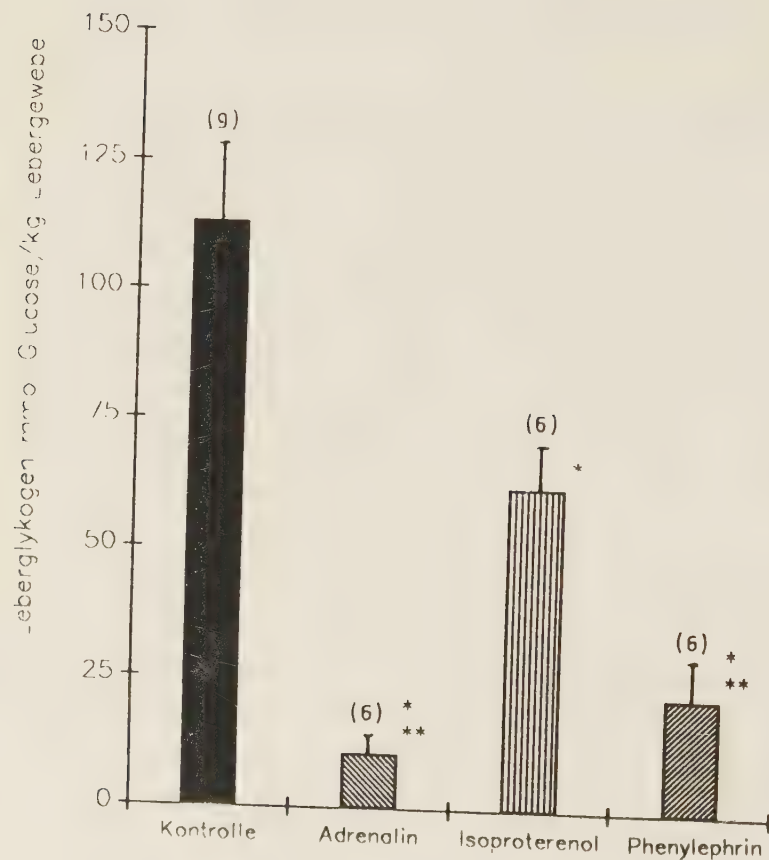


Abb. 6: Einfluß von adrenerg wirkenden Substanzen auf den Leberglykogengehalt

* $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollen
 ** $p < 0,001$ im Vergleich zu Isoproterenol

tungstag, 3 Stunden nach Applikation von adrenerg wirk-samen Substanzen, sind in Abb. 6 dargestellt. Adrenalin, Isoproterenol und Phenylephrin verursachten eine signifikante Abnahme des Leberglykogens. Adrenalinbe-handlung hatte dabei den stärksten Glykogenabfall zur Folge.

Demgegenüber waren beim Blutzucker - mit Ausnahme des Isoproterenol, das eine Hyperglykämie verursachte - keine Effekte zu beobachten (Abb. 7). Jedoch lösten Adrenalin, Isoproterenol und Phenylephrin eine deut-liche Steigerung des Serumlactatspiegels aus (Abb. 8). Der ausgeprägte Anstieg des Lactatspiegels bei gleich-bleibender Glucosekonzentration deutete auf eine Um-setzung der aus dem Glykogen freigesetzten Glucose zu Lactat hin.

In einem abschließenden Versuch wurden die Unter-suchungen mit Adrenalin auf den 17.-21. Tag ausgedehnt. Die Werte in Abb. 9 und Abb. 10 zeigen ein einheit-liches Ergebnis: Während des gesamten Untersuchungs-zeitraums löste Adrenalin einen um ca. 200 % höheren Lactatspiegel aus, dagegen veränderte es den Blutgluco-segehalt nicht.

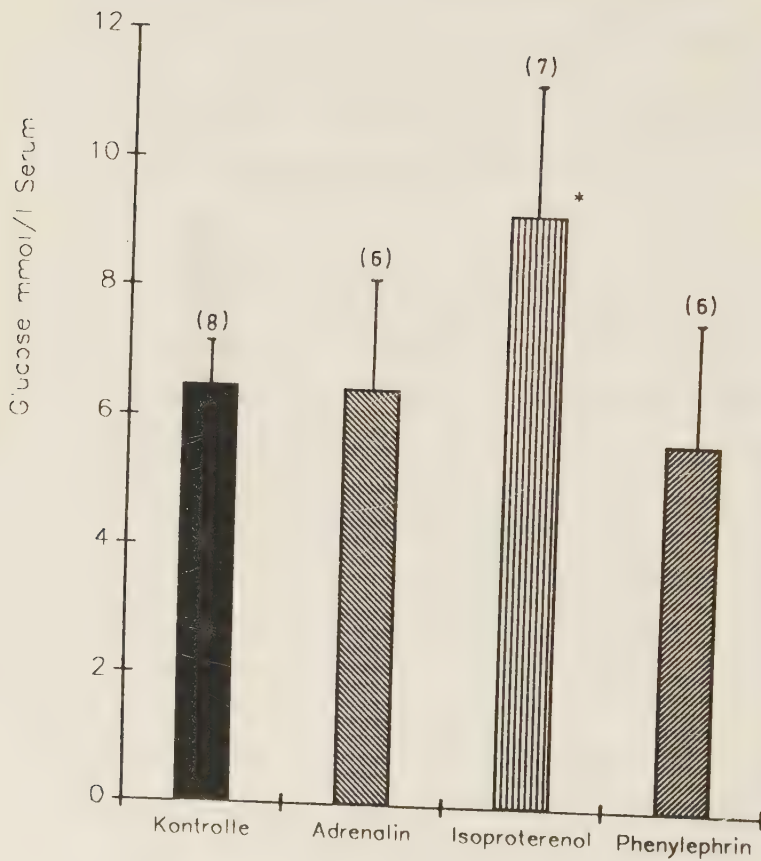


Abb. 7: Einfluß von adrenerg wirkenden Substanzen auf die Glucosekonzentration im Serum

* $p < 0,001$ im Vergleich zu den übrigen Werten

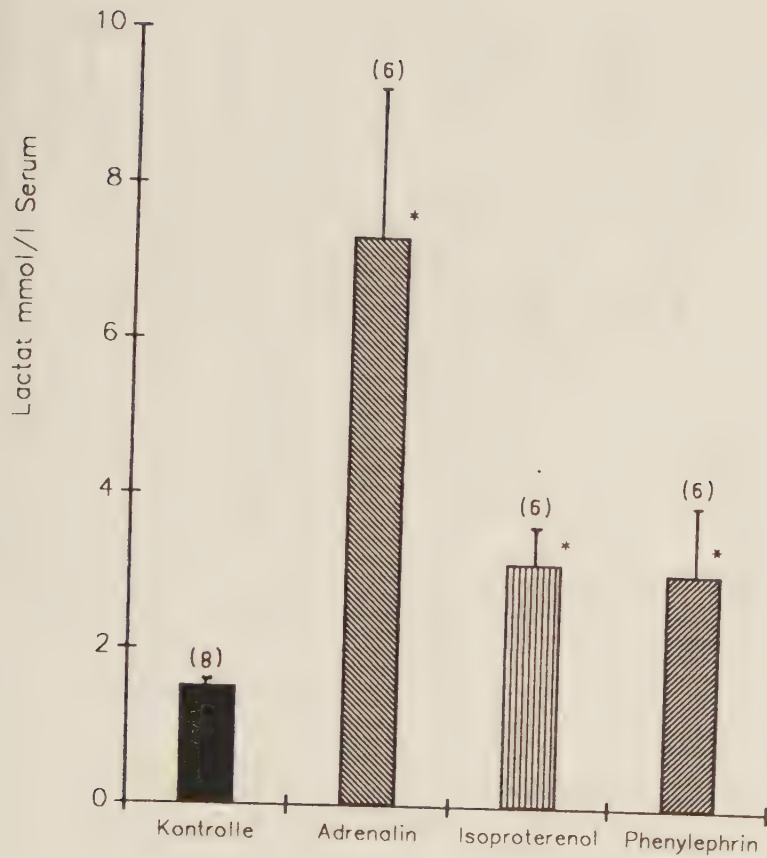


Abb. 8: Einfluß von adrenerg wirkenden Substanzen auf die Lactatkonzentration im Serum

* $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollen

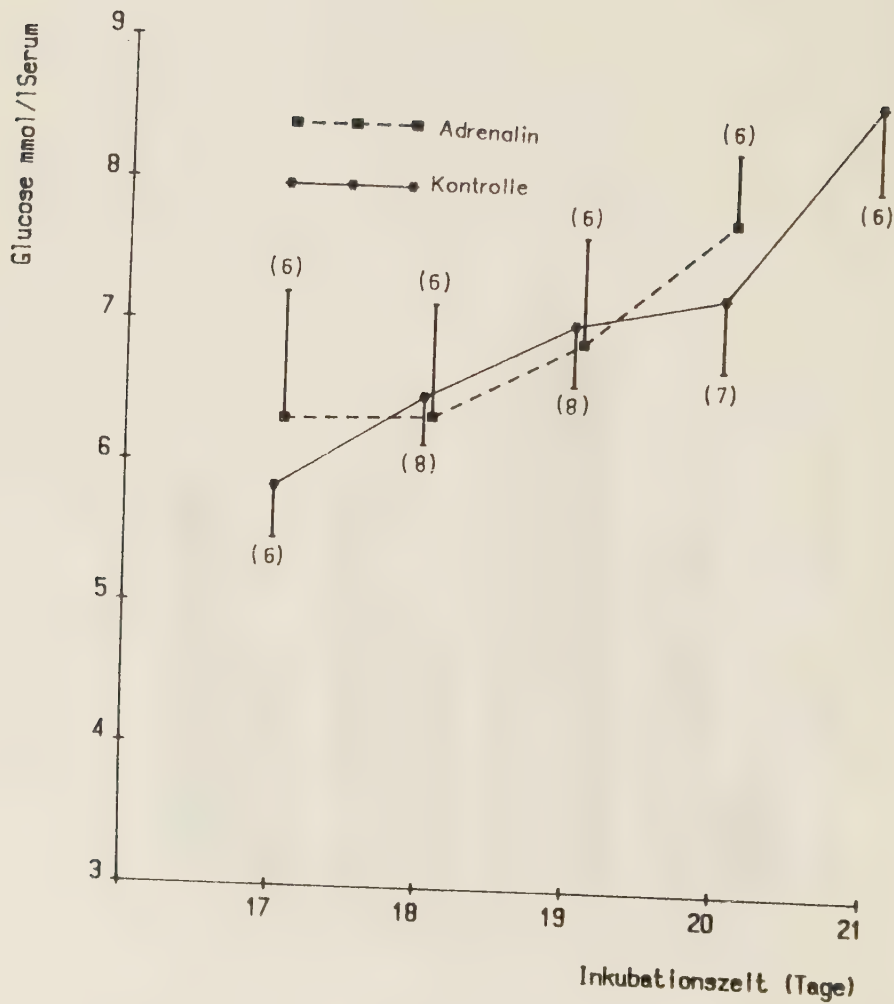


Abb. 9: Einfluß von Adrenalin auf die Glucosekonzentration im Serum

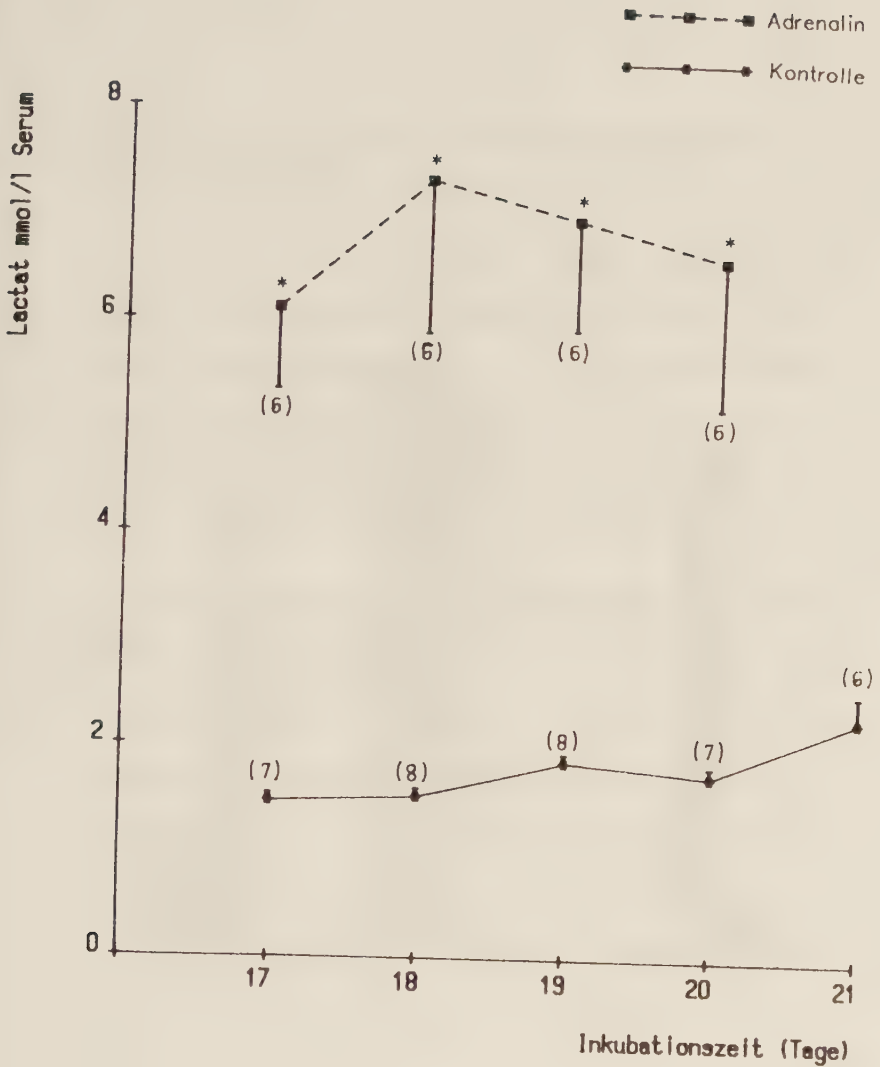


Abb. 10: Einfluß von Adrenalin auf die Lactatkonzentration im Serum

* $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollen

Die durch Adrenalin ausgelösten Effekte auf das Leberglykogen und den Blutlactatgehalt waren jedoch nur von kurzer Dauer. 24 Stunden nach Applikation des Katecholamins waren die Werte der Kontrollen wieder erreicht (Tab. 3). Diese Untersuchungen wurden am 17./18. Inkubationstag durchgeführt, da zu einem späteren Zeitpunkt die Gefahr bestand, daß der Effekt des exogenen Adrenalin durch den physiologisch einsetzenden Glykogenabfall (am 19. Tag vergl. Abb. 5) beeinträchtigt wird.

Abgesehen von adrenergen Substanzen konnte eine vorzeitige Glykogenolyse auch durch Hypoxie ausgelöst werden (Abb. 11). Wurden am 18. Tag der Bebrütung die Eier 2 Stunden einem Gas, mit 10 % O_2 und 90 % N_2 ausgesetzt, so hatte dies einen drastischen Abfall des Leberglykogens zur Folge. Gleichzeitig erhöhten sich die Lactatgehalte des Serums, während sich die Glucosekonzentration, ähnlich wie in den vorausgegangenen Versuchen, nicht veränderte.

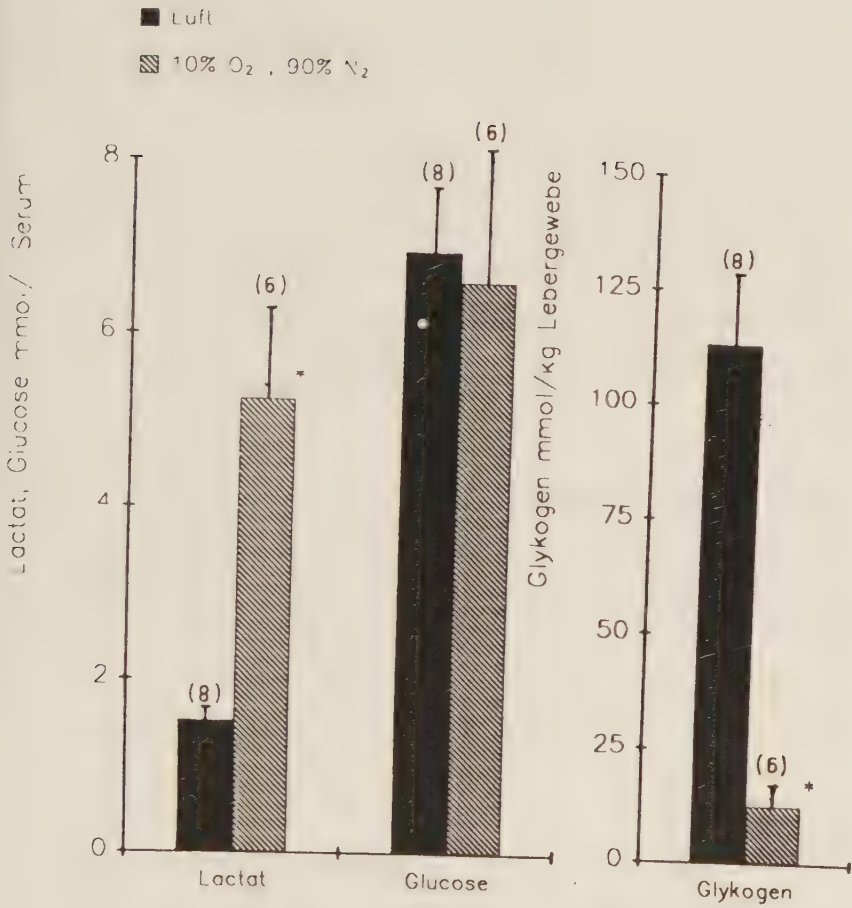


Abb.11: Konzentration von Leberglykogen, Blutglucose und Lactat nach Inkubation in Luft und in 10% O₂ , 90% N₂

* $p < 0,001$ gegenüber den Kontrollen



3.3 Einfluß der Katecholamine auf die Sauerstoffversorgung

Im vorausgehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß die gegen Ende der Inkubation einsetzende Hypoxie von einer erhöhten Ausschüttung der Katecholamine begleitet ist. Es stellte sich daher die Frage, ob umgekehrt die Katecholamine zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung beitragen.

Zu diesem Zwecke wurde zunächst der Einfluß von Adrenalin auf das 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) im Blut untersucht. Vom 2,3-DPG, einem Metabolit der Glykolyse, ist bekannt, daß seine Konzentration im Blut bei Hypoxie ansteigt. Durch eine Verbesserung der O_2 -Versorgung wäre demzufolge ein Absinken der 2,3-DPG Konzentration zu erwarten.

Der Einfluß von Adrenalin auf den Gehalt von 2,3-DPG im Blut ist in Abb. 12 dargestellt. Während des Untersuchungszeitraums war die 2,3-DPG Konzentration im Blut von Embryonen, denen 3 h vor der Blutentnahme Adrenalin verabreicht worden war, signifikant niedriger als bei Kontrollembryonen.

Tabelle 3:

Konzentration von Leberglykogen, Blutglucose und -lactat 3 bzw. 24 h nach Adrenalinapplication

	17. Bebrütungstag		18. Bebrütungstag	
	Kontrolle	3 h nach Adrenalin- applikation	Kontrolle	24 h nach Adrenalin- applikation
Glykogen mmol/kg	93,4 ± 8,1 n = 6	6,6 ± 2,1 n = 6	113,2 ± 14,4 n = 9	111,2 ± 16,8 n = 6
Glucose mmol/l	5,83 ± 0,37 n = 7	6,34 ± 0,68 n = 6	6,48 ± 0,34 n = 8	6,52 ± 0,40 n = 6
Lactat mmol/l	1,47 ± 0,08 n = 7	6,13 ± 0,77 n = 6	1,52 ± 0,09 n = 8	1,53 ± 0,10 n = 6

n = Anzahl der untersuchten Embryonen

Tabelle 4:
Einfluß von adrenerg wirkenden Substanzen auf Blutgase und Blutpuffer

		p O ₂ [mm Hg]	p CO ₂ [mm Hg]	O ₂ Sättigung [%]	pH	Gesamtbasenexzess [mval/l]
Kontrollen	n = 10	52,3 ± 1,64	36,6 ± 1,85	88,6 ± 1,25	7,459 ± 0,021	2,06 ± 0,85
Adrenalin	n = 9	72,9 ± 3,87 *	26,6 ± 3,27 *	95,6 ± 0,80 *	7,440 ± 0,069	-7,188 ± 3,87
Noradrenalin	n = 7	61,14 ± 4,53 */**	27,5 ± 2,24 *	93,0 ± 1,63 *	7,477 ± 0,092 ****	-5,02 ± 3,28
Phenylephrin	n = 7	62,3 ± 5,28 */**	25,8 ± 2,06 *	94,6 ± 1,18 *	7,509 ± 0,072 ***	-3,55 ± 3,0
Isoproterenol	n = 8	39,3 ± 4,13 *	36,6 ± 2,59	74,2 ± 2,7 *	7,400 ± 0,029	-2,01 ± 2,59
p	2.001 im Vergleich zu Kontrollen					
p	0.01 im Vergleich zu Adrenalinbehandelten					
p	0.01 im Vergleich zu Isoproterenolbehandelten					
p	< 0.05 im Vergleich zu Isoproterenolbehandelten					
n	= Anzahl der untersuchten Embryonen					

Des weiteren wurde der Einfluß verschiedener, adrenerg wirksamer Substanzen auf die Partialdrucke von O_2 und CO_2 , die Sauerstoffsättigung des Blutes und der Puffersysteme im Blut untersucht. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Der O_2 -Partialdruck war nach Verabreichung von Adrenalin, Noradrenalin und Phenylephrin gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Die höchsten O_2 -Partialdrucke wurden nach Adrenalinbehandlung gemessen. Die CO_2 -Partialdrucke waren, nach Applikation der obengenannten Substanzen signifikant niedriger als jene der Kontrollen. Die Sauerstoffsättigung des Blutes betrug bei Kontrollembrionen 88,6 %. Nach Adrenalinbehandlung war sie um 7 %, nach Noradrenalinbehandlung um 5,4 % und nach Phenylephrinbehandlung um 6 % angestiegen.

Nach der Behandlung mit Isoproterenol war der Sauerstoffpartialdruck um 13 mm Hg niedriger als bei den Kontrollen. Der pCO_2 Wert blieb unverändert, die O_2 -Sättigung des Bluts hatte sich signifikant auf 74,2 % vermindert.

Der pH-Wert hatte sich nach Behandlung mit Phenylephrin

und Noradrenalin leicht erhöht. Adrenalin bewirkte keine nennenswert Änderung des pH-Wertes, Isoproterenol führte zu einem Absinken des Blut pH-Wertes. Die Blut pH-Werte von Embryonen, die mit den vorwiegend α -mimetisch wirkenden Substanzen Phenylephrin und Noradrenalin behandelt wurden, lagen signifikant höher als die pH-Werte von Embryonen, welchen das β -Mimetikum Isoproterenol verabreicht worden war.

Die Applikation von adrenergen Substanzen bewirkte außerdem einen negativen Basenexzeß. Am stärksten waren die Pufferbasen nach Adrenalinbehandlung vermindert. Einen weniger deutlichen Verbrauch an Pufferbasen hatte die Verabreichung von Noradrenalin und Phenylephrin zur Folge. Isoproterenol verursachte unter den verwendeten Substanzen den geringsten Basenexzeß.

3.3.4 Einfluß von Adrenozeptoren-blockierenden Substanzen auf die Überlebenszeit von Hühnerembryonen bei O_2 -Mangel

Nach einer Bebrütungsdauer von 18 Tagen wurden Embryonen, denen Propranolol bzw. Phenoxybenzamin appliziert

worden war, in Luft und in einem Gasgemisch, das aus 10 % O_2 und 90 % N_2 bestand, inkubiert. Neben den behandelten Embryonen wurden auch Kontrollen der O_2 -verminderten Atmosphäre ausgesetzt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 5 dargestellt.

Die nach der Behandlung mit Propranolol ($n = 6$) und Phenoxybenzamin ($n = 6$), in Luft inkubierten Embryonen überlebten den Versuch.

Unter O_2 -Mangel überlebten alle Kontrollen mindestens 4 h, nach 8 h war noch die Hälfte von ihnen am Leben. Sieben von acht, der mit β -Blocker behandelten Embryonen, waren nach $1\frac{1}{2}$ Stunden tot, der 8. nach einer weiteren Stunde. Die mit α -Blocker behandelten Embryonen überlebten etwas länger. Sechs von ihnen überlebten mindestens $1\frac{1}{2}$ h, einer überlebte $2\frac{1}{2}$ h, war aber nach 4 h tot.

Tabelle 5:

Einfluß von Adrenozeptoren-blockierenden Substanzen auf die Überlebensdauer bei O_2 -Mangel (10% O_2 , 90% N_2)

Dauer des O_2 - Mangels	1½ h	2½ h	4 h	6 h	8 h
Kontrollen n = 8	0	0	0	3	1
Phenoxybenzamin n = 8	2	5	1	-	-
Propranolol n = 8	7	1	-	-	-

Anzahl der toten Embryonen zur Zeit t

3.4 *Einfluß von Katecholaminen auf den Blutkreis- lauf von Hühnerembryonen*

3.4.1 *Einfluß von adrenerg wirkenden Substanzen auf den Hämoglobingehalt von Chorioallantoismem- bran, Lunge und Niere*

*Zur Bestimmung des Einflusses von Katecholaminen auf die Gefäßquerschnitte von Chorioallantoismembran, Lunge und Niere, wurde der Hämoglobingehalt dieser Organe, bei Kontrollen und bei Embryonen, denen adrenerg wirk-
same Substanzen appliziert worden waren, gemessen. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Tab. 6 dargestellt. Neben den obengenannten Organen wurden auch die Lebern zur Hämoglobinbestimmung aufbereitet. Die Leberproben-
lösungen wiesen jedoch eine Trübung auf, weshalb ihre photometrische Messung nicht möglich war.*

*Der Hämoglobingehalt der Chorioallantoismembran von Em-
bryonen, die mit Adrenalin oder Noradrenalin behandelt
worden waren, lag signifikant höher als jener der Kon-
trollen. Die Hämoglobingehalte der Chorioallantoismem-
branen von Embryonen, denen die obengenannten Substan-*

Tabelle 6:

Einfluß von Adrenalin, Noradrenalin und Isoproterenol auf den Hämoglobingehalt von Chorioallantoismembran, Lunge und Niere

Hämoglobingehalt (optische Dichte/mg Protein)

	Chorioallantoismembran	Lunge	Niere
Kontrollen	8,01 ± 0,73 n = 12	10,99 ± 1,25 ** n = 8	14,08 ± 1,68 *** n = 8
Adrenalin	10,29 ± 0,85 * n = 10	10,23 ± 1,24 ** n = 8	11,14 ± 1,45 *** n = 8
Noradrenalin	10,56 ± 1,13 * n = 10	9,33 ± 0,82 ** n = 8	12,03 ± 1,43 *** n = 8
Isoproterenol	10,24 ± 1,14 * n = 12	12,80 ± 1,48 n = 9	8,20 ± 1,09 n = 9

* p < 0,001 im Vergleich zu Kontrollen

** p < 0,05 im Vergleich zu Isoproterenolbehandelten

*** p < 0,01 im Vergleich zu Isoproterenolbehandelten

**** p < 0,01 im Vergleich zu Kontrollen

n = Anzahl der untersuchten Embryonen

zen appliziert worden waren, unterschieden sich nicht wesentlich voneinander.

Lungen von Embryonen, die mit Noradrenalin behandelt wurden, hatten die niedrigsten Hämoglobingehalte. Dagegen führte die Applikation von Isoproterenol, gegenüber allen anderen Gruppen, zu einem signifikant höheren Hämoglobingehalt in den Lungen.

In Nieren von Embryonen, die mit Isoproterenol behandelt worden waren, wurden signifikant niedrigere Hämoglobingehalte gemessen als in den Nieren von Embryonen der übrigen Gruppen. In Nieren von Kontrollen wurden deutlich höhere Hämoglobingehalte gemessen als in Nieren von Embryonen, die mit einem Adrenergikum behandelt worden waren. Zwischen Kontrollen und Adrenalinbehandelten war der Unterschied signifikant.

3.4.2 Einfluß von adrenerg wirkenden Substanzen auf die Durchblutung der Chorioallantoismembran

Die Gasaustauschkapazität der Chorioallantoismembran wird unter anderem durch die Intensität ihrer Durchblu-

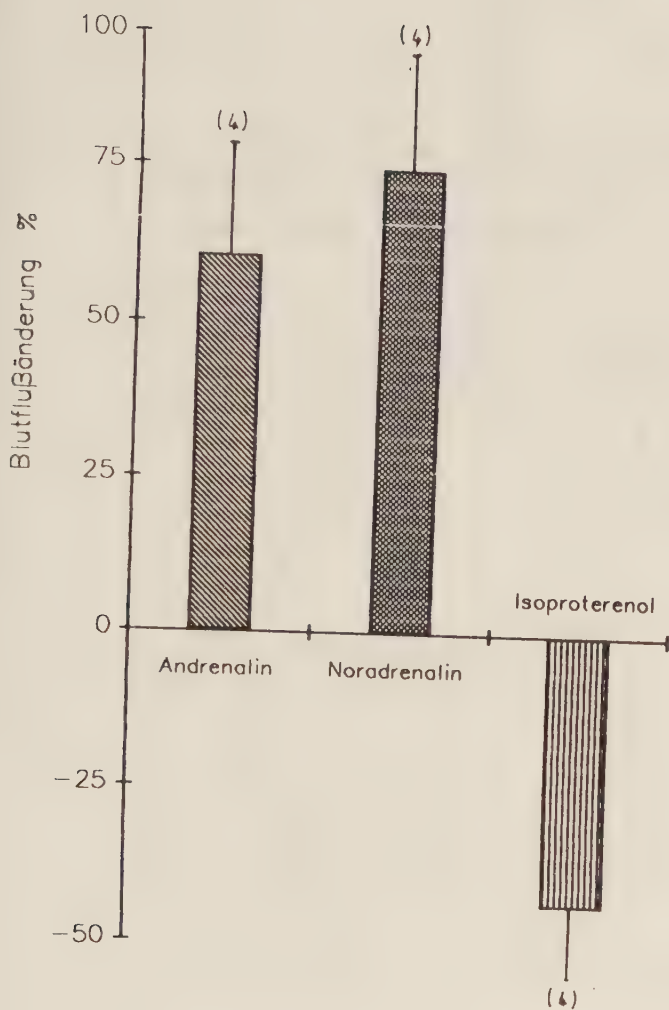


Abb.13: Einfluß von adrenerg wirkenden Substanzen auf die Durchblutung der Chorioallantois-membran

tung beeinflusst. Zur Bestimmung der Durchblutungsintensität der Chorioallantoismembran wurde der Blutfluß eines zu dieser Membran führenden Nabelgefäßes gemessen.

Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abb. 13 dargestellt. Nach Applikation von Noradrenalin kam es zu einer durchschnittlichen Blutflußzunahme um 76 %, nach Adrenalinverabreichung um 61 %. Isoproterenol bewirkte eine Verminderung des Blutflusses um durchschnittlich 44 %.

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen den Einfluß von Adrenalin bzw. Isoproterenol auf den Blutfluß der A. umbilicalis. Etwa 2 Minuten nach Applikation der entsprechenden Substanz begann sich die Blutflußkurve zu verändern. Nach Adrenalinverabreichung erreichte der Blutfluß ein Maximum und fiel anschließend wieder auf den Ausgangswert ab. Die Verminderung des Blutflusses nach Isoproterenolverabreichung ist von längerer Dauer.

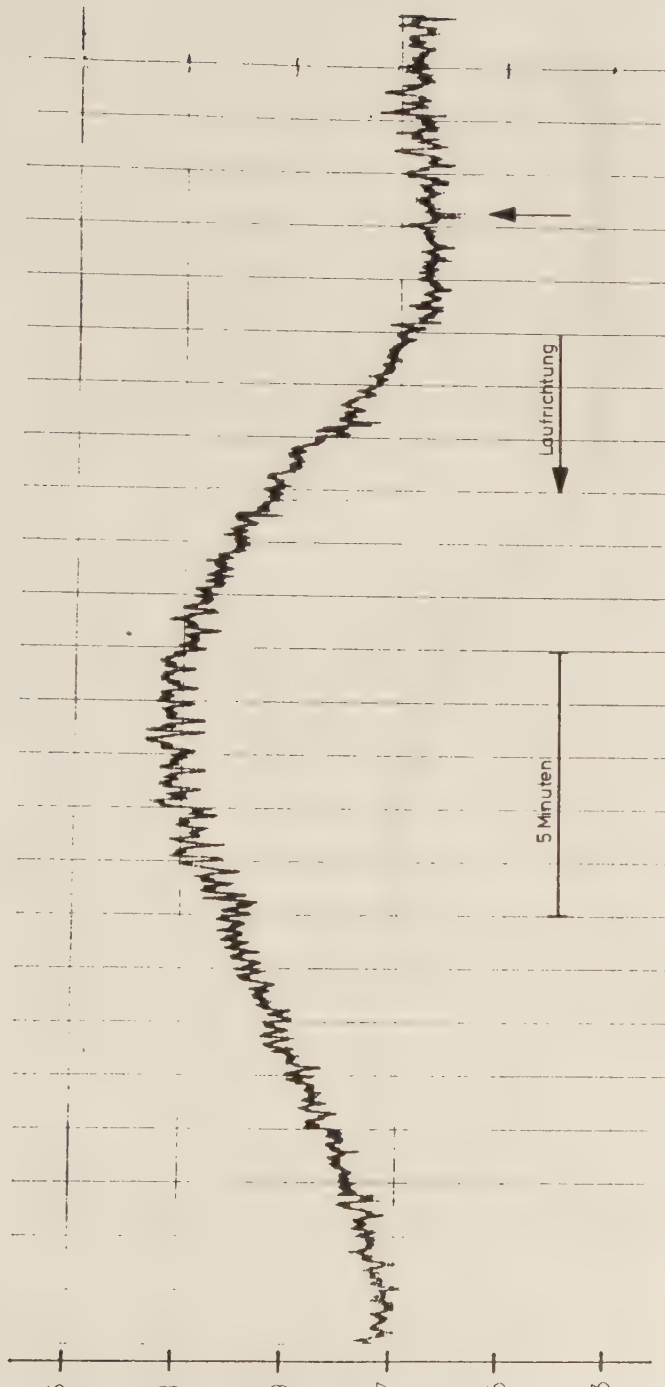


Abb. 14: Einfluß von Adrenalin auf den umbilicalen Blutfluß

↑ = Adrenalinapplikation

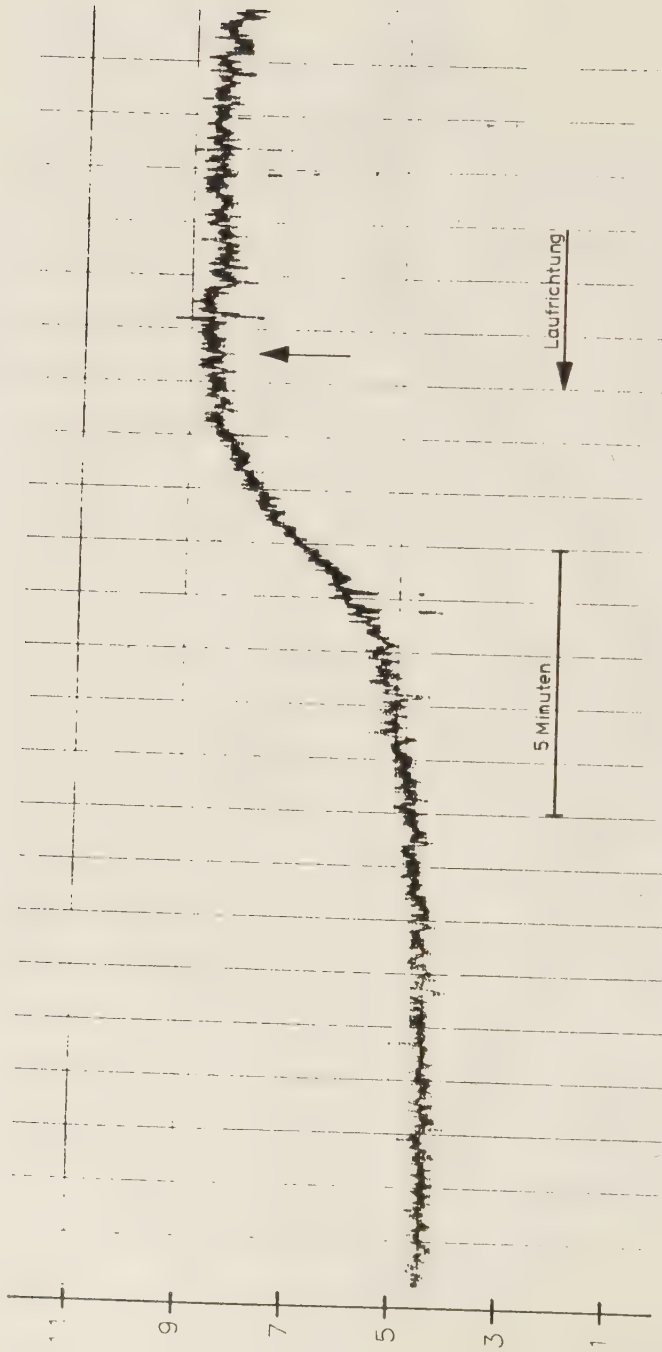


Abb. 15: Einfluß von Isoproterenol auf den umbilicalen Blutfluß
 ↑ = Isoproterenolapplikation

4. DISKUSSION

Der Übergang vom prä- in das neonatale Leben erfordert eine Anpassung des cardiovascularen Systems, der Atmung und des Stoffwechsels an die zu erwartenden neuen Lebensbedingungen. Dem adrenergen System wird in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle zugeschrieben (51).

Wie im allgemeinen Teil bereits erwähnt, ist das sympathische Nervensystem in dieser Phase der Ontogenese noch unvollständig entwickelt. Deshalb kommt dem humoralen Anteil des adrenergen Systems besondere Bedeutung zu.

Die Plasmaspiegel der Katecholamine zeigen beim Hühnerembryo einen charakteristischen Verlauf (Abb. 1). Er ist gekennzeichnet durch ein Maximum nach 19 Inkubationstagen. Beim Säuger wurden die höchsten Plasmakatecholamingehalte unmittelbar nach der Geburt gemessen. (81).

Der für den Hühnerembryo ermittelte Verlauf der Katecholaminkonzentrationen stimmt mit den Befunden von

Ignarro und Shideman (44) überein, wonach die Aktivitäten der MAO und der COMT, welche die Katecholamine inaktivieren, in Herz und Leber von Hühnerembryonen ebenfalls nach 19 Inkubationstagen ein Maximum aufweisen.

Damit stellt sich die Frage, welche Bedeutung diesem Verlauf zukommt bzw. wodurch er bedingt ist. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, daß der Katecholaminanstieg der Auslösung der Lungenatmung vorausgeht. Er vollzieht sich in der Endphase der Embryogenese, in der es zur Ausbildung einer Hypoxie und Hypercapnie kommt (96, 98).

Zwischen der Auslösung der Lungenatmung und der Ausbildung der Hypoxie bzw. Hypercapnie besteht offensichtlich ein Zusammenhang. Die Aufnahme von O_2 und die Abgabe von CO_2 erfolgt bis zum 19. Inkubationstag durch passive Diffusion nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz. Für das Vogelei bedeutet dies, daß die O_2 -Aufnahme durch die Fläche der Schalenporen und die Dicke der Eischale limitiert wird. Der wachsende Embryo hat aber einen sich ständig erhöhenden Sauerstoffverbrauch (79), der gegen Ende der Inkubation die Kapazitätsgrenze des Gasaustausches durch die Eischale erreicht (80). Da-

durch steigt im Nabelvenenblut der CO_2 -Partialdruck an, während der O_2 -Partialdruck absinkt (97, 98). In dieser Phase beginnt der Embryo mit der Lungenatmung.

Es ist die Vermutung naheliegend, daß diese Veränderungen in der Gaszusammensetzung, ähnlich wie beim Säuger, auch beim Vogel einen Stimulus für die Auslösung der Lungeatmung darstellen. Diese Vorstellung wird durch die Tatsache bekräftigt, daß ein artifiziell bedingter Abfall der O_2 -Spannung bzw. Anstieg der CO_2 -Spannung vorzeitige Atembewegungen zur Folge hat (101, 106). Jedoch läuft dieses Ereignis beim Vogel wesentlich langsamer ab, offensichtlich deswegen, weil Hypoxie bzw. Hypercapnie sich ebenfalls langsam - etwa innerhalb einer Woche (34) - ausbilden, während sie beim Säuger in wenigen Minuten entstehen.

In dieser kritischen Phase, die durch Hypoxie und Hypercapnie gekennzeichnet ist, greifen allem Anschein nach auch die Katecholamine ein. Die Befunde dieser Arbeit zeigen eindeutig, daß beim Hühnerembryo O_2 -Mangel die Katecholaminfreisetzung steigert (Tab. 2). Dabei stieg der Adrenalingehalt doppelt so stark an wie der Noradrenalingehalt. Eine ähnliche Situation ist

auch von Schaffeten bekannt. Dort wurde nach Konstriktion des Nabelstranges eine Verzehnfachung des Noradrenalingehaltes und ein um das 100-fache gesteigener Adrenalingehalt gemessen (59). Cohen et al. (20) fanden eine signifikante exponentiell inverse Korrelation zwischen der Plasmakatecholaminkonzentration und dem arteriellen pO_2 .

Anders als bei ungeborenen Lämmern und Küken verursachte eine Hypoxie bei neugeborenen Ratten einen proportionalen Anstieg von Adrenalin und Noradrenalin (91). Dies wird der unvollständigen Entwicklung der Nn. splanchnici zugeschrieben (60). In der Literatur wird nämlich die Meinung vertreten, daß die bevorzugte Freisetzung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark, die offensichtlich auch bei 18 Tage alten hypoxisch inkubierten Hühnerembryonen stattfindet, über nervale Steuerungen erfolgt (22, 23).

Neben der Beobachtung, daß die Katecholamine im hypoxischen Zustand erhöht sind, konnte in dieser Arbeit außerdem gezeigt werden, daß ihre exogene Zufuhr zu einer Veränderung der Blutgase führt (Tab. 4). Die Sauerstoffsättigung des Blutes und der pO_2 waren nach Appli-

kation von Adrenalin, Noradrenalin und Phenylephrin erhöht, der $p\text{CO}_2$ aber war vermindert.

Einen weiteren Hinweis auf die Funktion der Katecholamine bei der embryonalen O_2 -Versorgung ergab die Bestimmung des 2,3-Diphosphoglycerats (2,3-DPG), dessen Konzentration im Erythrozyten einen Einfluß auf die O_2 -Affinität des Hämoglobin hat (6). Frühere Arbeiten zeigen, daß eine Inkubation bei vermindertem $p\text{O}_2$ zu einem erhöhten 2,3-DPG Gehalt führt (48), während die Belüftung in Hyperoxie eine Reduzierung des 2,3-DPG bewirkte (8). Das 2,3-DPG kann deshalb als Indikator für die O_2 -Versorgung angesehen werden. Bei adrenalinbehandelten Feten wurde ein signifikant niedriger 2,3-DPG Gehalt im Blut gemessen als bei Kontrollen. Dies ist ein Indiz für eine Adrenalin-induzierte Verbesserung der O_2 -Versorgung.

Die Bedeutung der Katecholamine bei der Überwindung von O_2 -Mangelsituationen wird auch aus den Versuchen, in denen Adrenozeptorenblocker eingesetzt wurden, ersichtlich. Bei unter vermindertem $p\text{O}_2$ inkubierten Embryonen hatte die Verabreichung von Adrenolytica eine drastische Verkürzung der Überlebenszeit gegenüber Kon-

trollen zur Folge (Tab. 5). Ähnliche Ergebnisse liegen von neugeborenen Ratten vor (91). Auch hier bewirkte die Verabreichung von Rezeptorblockern eine deutliche Verkürzung der Überlebenszeit, wenn sie bei vermindertem pO_2 gehalten wurden. Kjellmer (54) und Jones (52) berichten über eine verminderte Toleranz von Feten und Neugeborenen gegenüber Hypoxie, wenn ihre Mütter mit β -Blockern behandelt wurden. Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, daß die Funktion der Katecholamine in der spätembryonalen und parafetalen Phase des Vogelembryos hinsichtlich des Gasaustauschs jener der Säuger in der fetalen und perinatalen Phase entspricht.

Auffallend ist jedoch, daß die Katecholaminkonzentration beim Vogelembryo weitaus höher ausfällt als beim Säuger in dieser Entwicklungsphase. Gegenüber den von Riechelt (81) für Schaffeten ermittelten Werten wurden im Plasma von Hühnerembryonen ca. 300mal so hohe Noradrenalin Spiegel und ca. 2000mal so hohe Adrenalin Spiegel gemessen. Bei Lämmern wurden die höchsten Plasmakatecholamingehalte unmittelbar nach der Geburt gemessen, bei Hühnerembryonen vor dem Einsetzen der Lungenatmung. Diese Maximalwerte lagen bei Hühnerembryonen

für Noradrenalin noch etwa 100mal höher, für Adrenalin 50mal höher als bei neugeborenen Lämmern. Bei erwachsenen Hühnern (11, 61, 62) wurden etwa doppelt so hohe Adrenalin und Noradrenalinspiegel gemessen wie bei Schafen. Der Grund für den hohen Katecholamingehalt bei Hühnerembryonen ist nicht bekannt.

Wie oben bereits ausgeführt, stellt die Ausbildung der Hypoxie bzw. Hypercapnie für den Embryo eine kritische Situation dar. Die Überwindung eines solchen Zustandes erfordert Regelmechanismen, welche, neben der O_2 -Versorgung der lebenswichtigen Organe, die Bereitstellung von energiereichen organischen Verbindungen gewährleisten. Im Vordergrund steht dabei die Mobilisierung von Glykogen. Wie die Befunde dieser Arbeit zeigen, besteht zwischen der Mobilisierung der Glykogenreserven der Leber und dem Katecholamingehalt im Plasma eine Korrelation.

Wie in der Einleitung ausgeführt, geht man davon aus, daß die glykogenolytische Wirkung der Katecholamine intrazellulär sowohl über cAMP als auch über Ca^{2+} vermittelt wird. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu bedenken, daß Wittmann und Weißenbeck (108) keinen cAMP-

Anstieg in der Leber von Hühnerembryonen um die Zeit der einsetzenden Glykogenolyse beobachten konnten. Sie favorisieren aufgrund ihrer Untersuchungen einen hypoxisch bedingten Auslösemechanismus der Glykogenolyse, der nicht cAMP-bedingt ist.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß Schmidt (90) die Glykogenolyse in der embryonalen Hühnerleber durch PO_4^{3-} auslösen konnte. PO_4^{3-} -Ionen, die als Inhibitoren der Phosphorylase- α -Phosphatase gelten und somit die Glykogen-Phosphatase aktivieren, steigen unter hypoxischen Bedingungen an (40, 53). Bedenkt man schließlich, daß um die Zeit der einsetzenden Glykogenolyse ein deutlicher Abfall von ATP stattfindet (107), so läßt sich daraus die Vorstellung ableiten, daß die aus der ATP-Spaltung anfallenden PO_4^{3-} -Ionen an der Mobilisierung des Glykogens beteiligt sind. Man hat freilich zu bedenken, daß die Glykogenolyse einen multifaktoriellen Prozeß darstellt, der auch andere Möglichkeiten, z.B. das obengenannte Ca^{2+} nicht ausschließt.

Legt man die oben ausgeführte Vorstellung zugrunde, daß die Glykogenolyse hypoxisch ausgelöst wird, so können auch daran Katecholamine ursächlich beteiligt sein.

Über die in der Einleitung erwähnten Wirkungen auf die Blutgefäße üben sie einen Einfluß auf die Durchblutungsintensität verschiedener Organe aus. Auf die Leberdurchblutung (72) wirken sie reduzierend. Dadurch tragen sie zur lokalen Hypoxie in der Leber bei.

Unabhängig davon wie sie zustande kommt, konnte die glykogenolytische Wirkung der Katecholamine in der spätembryonalen Phase des Hühnerembryos, durch den Abfall des Leberglykogengehalts (Abb. 6) und den Anstieg des Serumlaktatgehalts (Abb. 8) nach Katecholaminbehandlung, eindeutig nachgewiesen werden.

Der rapide Glykogenabbau, der nach Applikation von Adrenalin und Phenylephrin oder durch Inkubation in O_2 -verminderter Atmosphäre eintrat, führte zu keiner wesentlichen Veränderung des Blutglucosegehalts. Lediglich Isoproterenolbehandlung bewirkte eine Hyperglykämie. Dagegen stiegen die Laktatkonzentrationen im Serum deutlich an. Dies steht im Widerspruch zur von Gracia (34) geäußerten Annahme, die Aufrechterhaltung der Serumlaktatkonzentration sei von größerer homöostatischer Bedeutung als die des Blutzuckergehaltes. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Hühnerembryonen

über eine große Toleranz gegenüber hohen Serumkonzentrationen an Lactat, dem Endprodukt der Glykolyse, verfügen. Dies eröffnet ihnen die Möglichkeit der anaeroben Energiegewinnung. Das dabei entstehende Lactat dient, nach Beendigung des zum Glykogenabbau führenden Ereignisses (Adrenalinbehandlung, Hypoxie), als Substrat der Gluconeogenese (12). In den durchgeführten Versuchen hatten sich die nach Adrenalinbehandlung stark veränderten Leberglykogen- und Serumlactatgehalte 24 Stunden später wieder normalisiert (Tab. 3). Dies kann als Zeichen einer intensiven Gluconeogenese gesehen werden, die im Gegensatz zum Vogel, beim Säuger in dieser Entwicklungsphase noch nicht entwickelt ist.

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, daß Katecholamine eine zentrale Rolle in der Regulierung des embryonalen Gasaustausches spielen. Es stellt sich die Frage, auf welche Weise diese Wirkung zustande kommt. Die Zunahme des arteriellen pO_2 und der Sauerstoffsättigung und die Abnahme des pCO_2 sind nicht auf eine verminderte Stoffwechselintensität zurückzuführen, da diese durch Katecholamine sogar gesteigert wird (76). Die veränderten Blutgasparameter sind deshalb eher einer erhöhten Austauschkapazität des Gaswechselorgans,

der Chorioallantoismembran und nicht einem eingeschränkten O_2 -Verbrauch zuzuschreiben.

Die respiratorische Leistung eines Gasaustauschorgans hängt von seiner Ventilation mit Atemgas, der Diffusion der Atemgase und von seiner Durchblutung ab. Die Partialdrucke von O_2 und CO_2 und die Sättigung des Blutes mit O_2 sind ein Maß für diese Leistung. Die gesteigerte O_2 -Sättigung des Blutes von 18 Tage alten Hühnerembryonen nach Katecholaminbehandlung kann nur auf dem Weg einer erhöhten Durchblutung der Chorioallantoismembran erreicht werden, da die Ventilation des Eies und die Diffusionsfläche und -strecke unverändert bleiben.

Die Abhängigkeit des arteriellen pO_2 von der Durchblutung der Plazenta wurde auch an Schaffeten gezeigt (43). Durch die gesteigerte Durchblutung der Chorioallantoismembran ist die CO_2 -Abgabe erhöht. Eine gesteigerte CO_2 -Abgabe und damit verbunden eine Senkung des pCO_2 und der H^+ -Konzentration, erhöhen die O_2 -Affinität des Hämoglobin. Dieses als Bohr-Effekt bezeichnete Phänomen wurde auch an Erythrozyten von 18 Tage alten Hühnerembryonen nachgewiesen (50). Umgekehrt unterstützt die Oxygenierung von Hämoglobin die Abgabe

von CO_2 (Haldane-Effekt). Neben der Aufrechterhaltung der O_2 -Versorgung, ist die Steigerung des Gasaustausches auch für die Erhaltung eines physiologischen Blut-pH von Bedeutung. Die im asphyktischen Organismus durch anaerobe Glykolyse verursachte metabolische Acidose, wird so respiratorisch kompensiert.

Untersuchungen über die cardiovascularen Reaktionen von Schaffeten auf Hypoxie zeigen (46, 74), daß das fetale Herzzeitvolumen und der relative plazentare Blutfluß erhöht sind. Den Katecholaminen wird bei der im hypoxischen Zustand notwendigen Umverteilung des Blutflusses große Bedeutung beigemessen. Eine permissive Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf den umbilikalischen Blutfluß konnte an 18 Tage alten Hühnerembryonen gezeigt werden (Abb. 13, 14).

Die vorliegenden Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die über Adrenozeptoren vermittelte relative Zunahme der Durchblutung der Chorioallantoismembran durch eine α -mimetische Wirkung erfolgt. Die Zunahme der Gefäßlumina der Chorioallantoismembran dürfte auf eine Vaskokonstriktion in anderen Organen und nicht auf eine Senkung ihres Gefäßtonus zurückzuführen sein. Die Kon-

striktion der Nierengefäße scheint über eine vorwiegend β -agonistische Reaktion zustandezukommen. Dagegen hatte das β -Mimetikum Isoproterenol auf die Lungengefäße dilatatorische Wirkung, während exogenes Noradrenalin zu einem verminderten Hämoglobingehalt in der Lunge führte. Die Zunahme des Adrenalinanteils, die vor dem Einsetzen der Lungenatmung beginnt (Abb. 4) könnte für die hierzu nötigen vaskulären Reaktionen von Bedeutung sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Katecholaminspiegel im Blut von Hühnerembryonen vom 17. Inkubationstag bis zum Schlupf bestimmt. Dazu wurden sie mit Diphenylborsäure aus dem Plasma extrahiert, mit einer HPLC-Anlage aufgetrennt und mittels elektrochemischer Detektion identifiziert und quantifiziert.

Der Katecholamingehalt des Plasmas erreichte nach 19 Inkubationstagen kurz vor dem Einsetzen der Lungenatmung ein Maximum. Es fällt mit dem Höhepunkt der sich gegen Ende der Inkubation entwickelnden Hypoxie des Embryos zusammen.

Weiterführende Versuche zeigten, daß ein erhöhter Katecholaminspiegel die O_2 -Versorgung des Embryos verbessert. Darauf weisen die veränderten Blutgaswerte und 2,3-DPG-Gehalte nach Katecholaminbehandlung, sowie die verkürzten Überlebenszeiten bei Inkubation unter vermindertem pO_2 nach Verabreichung von Adrenorezeptorenblockern hin.

Außerdem zeigten sich auffallende Parallelen zwischen

dem Ansteigen der Katecholamine und dem Abbau des Leberglykogens. Dies legt die Vermutung nahe, daß Katecholamine an der Glykogenolyse beteiligt sind. Möglicherweise kommt dieser Effekt, neben der direkten Wirkung auf die Rezeptoren der Leberzellen, über zirkulatorische Veränderungen zustande.

Schließlich wurde in der Arbeit gezeigt, daß Katecholamine bei Hühnerembryonen eine vasoaktive Wirkung entfalten, die zu einer gesteigerten Durchblutung der Chorioallantoismembran und somit zu einer Verbesserung der O_2 -Versorgung führt.

Insgesamt zeigen die Versuche, daß den Katecholaminen gegen Ende der Inkubation eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Gasaustausches zukommt.

SUMMARY

Determination and Function of Catecholamines in the late Embryonal Phase of the Chick.

The present study describes catecholamine levels in the blood of embryonic chicks from the 17th day of incubation until hatching. The catecholamines were extracted from the plasma with diphenyl boric acid and separated with an HPLC device for identification and quantification by means of electrochemical detection.

The catecholamine level of the plasma reached a maximum after 19 days of incubation, shortly before the beginning of the respiratory lung function. It occurs concurrently with the climax of embryo hypoxia which develops toward the end of incubation.

Further investigations showed that an increased catecholamine level improves the O_2 supply to the embryo. This is indicated by the change in blood gas values and 2,3-DPG levels after catecholamine treatment, as well as the shortened survival times during incubation under

reduced pO_2 after administration of adrenoreceptor-blocking drugs.

Conspicuous parallels also emerged between the increase of catecholamines and the decrease of liver glycogen. This led to the assumption that catecholamines play a role in glycogenolysis. It is possible that this effect, besides the direct influence on the receptors of the liver cells, is the result of circulatory changes.

Finally it was shown that catecholamines have a vasoactive effect in chicken embryos, which enhances circulation in the chorioallantois membrane and thereby improves O_2 supply.

Altogether the investigations demonstrated the importance of catecholamines toward the end of incubation in the regulation of gas exchange.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alquist, R.P., (1948).

A study of the adrenotropic receptors.

Am.J.Physiol. 153, 586-600.

2. Allen, H.J., (1919).

Glycogen in the chick embryo.

Biol.Bull. 36, 63-70.

3. Axelrod, J., (1975).

*Catechol O-methyltransferase and other
O-methyltransferases.* pp. 669-677

*In: Greep R.O., Astwood E.B. Handbook of
Physiology, Section 7: Endocrinology, Volume VI.,
Adrenal Gland, Washington.*

4. Axelrod, J., (1962).

*Purification and properties of phenylethanolamine-
N-methyltransferase.*

J.Biol.Chem. 237, 1657-1660.

5. Ballard, F.J. and Oliver, T., (1963).

*Glycogenmetabolism in embryonic chick and neonatal
rat liver.*

Biochem. Biosphys.Acta 71, 578-588.

6. Bartels, H., Hiller, G., and Reinhardt, W.,
 (1966).
 Oxygen affinity of chicken blood before and after
 hatching.
 Respir. Physiol. 1, 345-356.

7. Bassett, J.M., (1970).
 Metabolic effects of catecholamines in sheep.
 Austr. J. biol. Sci., 23, 903-914.

8. Baumann, Rosemarie, E.A. Halle, U. Schönig, and
 M. Weber, (1986).
 Hypoxic Incubation Leads to Concerted Changes of
 Carbonic Anhydrase Activity and 2,3-DPG Concentra-
 tion fo Chick Embryo Red Cells.
 Developmental Biology 116, 548-551.

9. Betke, K., und W. Savelsberg, (1950).
 Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels
 Cyanhämoglobin.
 Biochem. Z. 320, 431-439.

10. Blaschko, H., (1939).
 The specific action of L-Dopa decarboxylase.
 J. Physiol (Lond.) 96, 50-51.

11. Bottje, Walter G. and Paul C. Harrison,
(1986).
*Alpha Adrenergic Regulation of Celiac Blood Flow
and Plasma Catecholamine Response During Acute
Heat Stress in Fed Cockerels.*
Poultry Science 65, 1598-1605.
12. Brady, L.J., Romsos, D.R. and Leveille, G.A. (1979).
Gluconeogenesis in isolated chicken.
Comp. Biochem. Physiol. 63, 193-198.
13. Brittain, R.T., (1971).
*A comparison of the pharmacology of salbutamol
with that of isoprenaline, orciprenaline and
trimetoquinol.*
Postgrad.Med.J.Suppl. 47, 11-16.
14. Brown, M.J., Olver, R.E., Ramsden, C.A., Strang,
L.B., Walters, D.V., (1983).
*Effects of adrenaline and of spontaneous labour on
the secretion and absorption of lung liquid in the
fetal lamb.*
J.Physiol (London), 344, 137-152.

15. Buznikov, G.A., I.V. Chudakova, L.V. Berdysheva,
N.M. Vyazmina, (1968).
The role of neurohumoural early embryogenesis.
II. Acetylcholine and catecholamine content in
developing embryos of sea urchins.
Embryol. Exp. Morphol., 20: 119-128.

16. Caston, J.D., (1962).
Appearance of catecholamines during development of
Rana pipiens.
Develop.Biol.5: 468-482

17. Cannon, W.B.. and A. Rosenblueth, (1937).
Automatic Neuroeffector Systems.
New York: Macmillan

18. Castro de la Mata, R., M. Penna, and D.M. Aviado,
(1962).
Reversal of sympathomimetic bronchodilation
by dichloroisoproterenol.
J. Pharmacol.Exptl. Therap. 135: 197-203

19. Cheung Cecilia Y., (1985).
Regulation of Adrenal Medulla Catecholamine

Secretion in the Fetus.

In: E. Albrecht and G.J. Pepe (eds.)

Perinatal Endocrinology 105-127.

Perinatology Press.

20. Cohen, Wayne R., George J. Piasecki, and Benjamin T. Jackson, (1982).

Plasma catecholamines during hypoxemia in fetal lamb.

Am.J.Physio.243: R520-R525.

21. Comline, R.S. and Filver, M., (1966).

Development of activity in the adrenal medulla of foetus and newborn animal.

Br.Med.Bull. 22, 16-23.

22. Comline, R.S., Silver, M., (1961).

The release of adrenaline and noradrenaline from the adrenal glands in the fetal sheep.

J.Physiol.156: 424-431

23. Comeline, R.S., Silver, I.A., Silver M., (1965).

Factors responsible for the stimulation of the adrenal medulla during asphyxia in the fetal lamb.

J.Physiol. 178: 211-218.

24. Daniel, S.S., Stark, R.I., Zubrow, A.B., Fox, H.E., Husain, H.K., and James, L.S., (1983).
Factors in the release of vasopressin by the hypoxic fetus.
Endocrinology 113, 1623-1632.
25. Davison, A.N., (1958).
Physiological Role of monoamino Oxidase.
Physiol.Ref. 38: 729-747.
26. Dehnert H., (1986)
Methoden der Blutflußmessung am Tier.
In: 2. Freiburger Fortbildungsseminar Biomeß-technik, 17-26.
Biomeßtechnik-Verlag March.
27. Douglas, W.W. and R.P. Rubin, (1961).
The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine.
J.Physiol., London 159, 40-57.
28. Douglas, W.W., and R.P. Rubin, (1963).
The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling.
J.Physiol., London 167, 288-310.

29. Duncker, H.R., (1978).
Development of the avian respiratory and circulatory systems
In: Piiper, J. (ed.), *Respiratory function in birds, adult and embryonic*, 260-273.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
30. Eranko, O., (1952).
On the Histochemistry of the Adrenal Medulla of the Rat, with Special Reference to Acid Phosphatase.
Acta anat., Basel, Suppl. 16. 1-60.
31. Fowden, A.L., (1980).
Effects of adrenaline and amino acids on the release of insulin in the sheep fetus.
J. Endocr., 87, 113-121.
32. Freeman, B.M., and B.H. Misson, (1970).
pH, pO₂ and pCO₂ of blood from the foetus and neonate of Gallus domesticus.
Comp. Biochem. Physiol. 33, 763-772.

33. Geis, W.P., Tatrooles C.J., Priola, D.V., Friedman W.F., (1975).
Factors influencing neurohumoral control of the heart in the newborn dog.
Am.J.Physiol., 228, 1685-1689.
34. Gracia, F.J., A. Pons, M.A. Lemany and A. Palou (1986).
Tissue Glycogen and lactat handling by the developing domestic fowl.
Comp. Biochem. Physiol. 85, 155-159.
35. Graham, A.D.H., Longo, L.D. and Cheung, C.Y., (1985).
Catecholamine secretion from the adrenal medulla of the fetus-regulation by hormones.
Submitted to J.Develop. Physiol.
36. Greengard, O., and Thorndike, J., (1974).
Changing enzyme patterns in chick organs during development.
Enzyme 17, 1974, 333-378.

37. Guder, W.L., and O. Wieland, (1969).
Trglyceride breakdown in rat liver. The
demonstration of three different lipases.
Biochem. Biophys. Acta. 187, 173-185.
38. Güllner, H.G., (1983).
Regulation of sodium and water metabolism by
catecholamines.
Life Sci., 32, 921-925.
39. Harrison, T.S., Birbari, A. and Seaton, J.F.,
(1973).
Reinforcement of reflex epinephrine release by
angiotensin.
II. Am.J. Physiol. 224, 31-36.
40. Hems, D.A., and Brosnau, J.T., (1970).
Effects of ischaemia on content of metabolites in
rat liver and kidney in vivo.
Biochem.J. 120, 105-111.
41. Hochachka, P.W., (1986).
Defense strategies against hypoxia and
hypothermia.
Science 231, 234-241.

42. Hopwood, D., (1971).
*The Histochemistry and electron microscopy of
chromaffine tissue.*
Fischer, Stuttgart
43. Huikeshoven, F.J., Inez D. Hope, Gordon G. Power,
Raymund D. Gilbert, and Lawrence D. Longo, (1985).
*Mathematical model of fetal circulation and oxygen
delivery.*
J. Physiol. 249, 192-202.
44. Ignarro, L.J., and F.E. Shideman, (1968).
*Catechol-O-Methyl transferase and monoamine
oxidase activities in the heart and liver of the
embryonic and developing chick.*
J.Pharmacol. Exp.Therap. 159, 29-37.
45. Ignarro, L.J., and F.E. Shideman, (1968a).
*Appearance and concentrations of catecholamines
and their biosynthesis in embryonic and developing
chick.*
J. Pharmacol.Exp.Ther., 159: 38-48.

46. Ignarro, L.J., and F.E. Shideman, (1968b).
Norepinephrine and epinephrine in the embryo and
embryonic heart of the chick: Uptake and subcellar
distribution.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 159:49-58.
47. Ikedu, M.L., A. Fahien, and S. Udenfriend, (1966).
A kinetic study of bovine adrenal tyrosine
hydroxylase.
J. Biol. Chem. 241, 4452-4456.
48. Ingermann, Rolf L., Michael K. Stock, James
Metcalf and Tzu-Bi Shih, (1983).
Effect of Ambient Oxygen on Organic Phosphate
Concentrations in Erythrocytes of the Chick
Embryo.
Resp. Physiol. 51, 141-152.
49. Ingram, R.H., J.P. Szidon, R. Skalak, and A.P.
Fishman, (1968).
Effects of sympathetic nerve stimulation on the
pulmonary arterial tree of the isolated lobe
perfused in situ.
Circulation Res. 22: 801-815.

50. Isaacks, Russell, Phyllis Goldman, and Chang Kim, (1986).
Studies on avian erythrocyte metabolism, XIV. Effect of CO₂ and pH on P₅₀ in the chicken.
Am. J. Physiol 250: 260-266.
51. Jones, C.T., (1980).
Circulating catecholamines in the fetus, their origin, actions and significance.
In Biogenic Amines in Development, ed. Parvez, H. & Parvez, S., pp.63-86, Amsterdam: Elsevier/North-Holland.
52. Jones, C.T. and Ritchie, J.W.K., (1983).
The effects of adrenergic blockade on fetal response to hypoxia.
J. Develop.Physiol. 5, 211-219.
53. Khandelwal, R.L., (1977).
Some properties of purified phosphoprotein phosphatases from rabbit liver.
Biochem.Biophys.Acta 485, 379-390.

54. Kjellmer, I., Dagbjartsson, A., Hrbek, A.,
Karlsson, K., Rosen, K.G., (1984).
Maternal beta-adrenoceptor blockade reduces fetal
tolerance to asphyxia.
Acta obstet.gynec.scand.,suppl.118, pp. 75-80.
55. Kilsheimer, G.S., Weber, D.R. and Ashmore, (1960).
Hepatic glucose production in developing chicken
embryo.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 104, 515-518
56. Lawson, E.E., Brown, E.R., Torday, J.S., Madansky,
D.L., Taeusch, H.W., (1978).
The effect of epinephrine on tracheal fluid flow
and surfactant efflux in fetal sheep.
Am.Rev.resp.Dis., 118, 1023-1028.
57. Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., and
Udenfriend, S., (1965).
Elucidation of the rate-limiting step in nor-
epinephrine biosynthesis in the perfused guinea-
pig heart.
J.Pharmacol.Exp. Therap. 148, 1-8.

58. Lewis, A.B., Evans, W.N. and Sischo, W., (1982).
Plasma catecholamine responses to hypoxemia in
fetal lambs.
Biol.Neonate 41, 115-122.
59. Lewis, A.B., William Sischo, (1985).
Cardiovascular and Catecholamine Responses to
Hypoxemia in Chemically Sympathectomized Fetal
Lambs.
Dev. Pharmacol. ther., 8 (2), 129-140.
60. Lewis, G.P., (1975).
Physiological mechanisms controlling secretory
activity of adrenal medulla.
In *Handbook of Physiology*, section 7, vol. VI, ed.
Geiger, S.R., 309-319. Washington, D.C., American
Physiological Society.
61. Lin, Y., and P.D. Sturkie, (1968).
Effect of environmental temperatures on the
cataecholamines of chicken.
Am.J.Physiol. 214, 237-240.

62. Liou, S.S., H.V. Biellier, and R.R. Gaddis, (1984).
Quantitation of plasma norepinephrine and epinephrine in chicken hens using a chronic catheterization technique.
Poultry Sc. 63 (Suppl.) 140-146.
63. Marcolis, F.L., Roffi, J. and Jost, A., (1966).
Norepinephrine methylation in fetal rat adrenals.
Science 154, 276-285.
64. McGeer, P.L., and E.G. McGeer, (1964).
Formation of adrenaline by brain tissue.
Biochem.Biophys.Res. Commun. 17, 502-511.
65. Molinoff, P.B., and Axelrod, J., (1971).
Biochemistry of catecholamines.
Ann.Rev. Biochem. 40, 465-500.
66. Moran, N.C., and M.E. Perkins, (1958).
Adrenergic blockade of the mammalian heart by a dichloro analogue of isoproterenol.
J. Pharmacol. Exptl. 124, 223-237.

67. Moran, N.C., (1967).
The development of beta adrenergic blocking drugs:
a retrospective and prospective evaluation.
Ann. NY Acad.Sci. 139, 649-660.
68. Moran, N.C., and M.E. Perkins, (1961).
An evaluation of adrenergic blockade of the
mammalian heart.
J. Pharmacol.Exprt1. Therap. 131, 192-201.
69. Mueller, R.A., Theonen, H. and Axelrod, J.,
(1969).
Adrenal tyrosine hydroxylase: compensatory
increase in activity after chemical sympathectomy.
Science 163, 468-471.
70. Nickerson, M., and G.C-M. Chan, (1961).
Blockade of responses of isolated myocardium to
epinephrine.
J.Pharmacol.Exptl.Therap. 133, 186-191.
71. Nissen, H.P., W. Wehrmann und H.W. Kreysel (1985).
Anwendung der HPLC mit elektrochemischer Detektion
zur Bestimmung der Plasma-Catecholamine - ein
Erfahrungsbericht nach zweijähriger Anwendung.
Beckmann Report 85, 307-323.

72. Northrop, G. and Parks, R.E., Jr., (1964).
Studies on epinephrine and 3',5'-AMP-induced
hyperglycemia employing the isolated perfused rat
liver preparation.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 145;135-141.
73. Norusis, M.J. 1986.
SPSS/PC for the IBM PC/XT/AT.
SPPSS Inc. Chicago.
74. Palmer, Sue M., M.D., Gary K. Oakes, M.D., Jean A.
Champion, B.A., Delbert A. Fisher, M.D., and
Calvin K. Hobel, M.D., (1984).
Catecholamine physiology in the ovine fetus.
III. Maternal and fetal response to acute maternal
exercise.
Am. J. Obstet. Gynecol. 149, 426-434.
75. Peach, M.J., (1971).
Adrenal medullary stimulation induced by
angiotensin I, angiotensin II and analogues.
Circulation Res. (Suppl II) 28-29, II 107-123.

76. Pearce, J., and W.O. Brown (1971).
Carbohydrate metabolism.
In: D.J. Bell, B.M. Freeman (eds.) *Physiology of the domestic Fowl*. Volume 1, pp. 295-316.
Academic Press, London, New York.
77. Pohoresky, L.A., M. Zigmond, H. Karten, and R.J. Wurtman, (1969).
Enzymatic conversion of norepinephrine to epinephrine by the brain.
J.Pharmacol. 165, 190-195.
78. Pohoresky, L.A. and Wurtman, R.J., (1971).
Adrenocortical control of epinephrine synthesis.
Pharmacological Reviews 23, 1-8.
79. Rahn, H., C.V. Paganelli and A.Ar, (1974).
The avian Egg: Air-Cell gas tension, metabolism and incubation time.
Respir. Physiol 22, 297-309.
80. Rahn, H., C.V. Paganelli and A.Ar, (1979).
How Bird Eggs Breathe.
Sci. Amer. 240, 46-55.

81. Richet, Elisabeth, Marie-Jeanne Davicco,
J.-P. Barlet, (1985).
*Plasma catecholamine concentrations in lambs
and calves during the perinatal period.*
Reprod. Nutr. Dévelop. 25 (6), 1007-1016.
82. Robison, G.A., R.W. Butcher, and E.W.
Sutherland, (1971).
Cyclic AMP.
New York: Acad.Press, chapt.6.
83. Romanoff, A.L., (1960).
The avian embryo.
Wiley, New York, 177-232.
84. Romanoff, A.L., (1967).
Biochemistry of the avian embryo.
John Wiley, New York, 143-176.
85. Romijn, C., and J. Roos, (1938).
*The air space of the hen's egg and its changes
during the period of incubation.*
J. Physiol., Lond., 94, 365-379.

86. Romijn, C., (1948).
Respiratory movements of the chicken during the
parafoetal period.
Physiol. comp. Oecol. 1, 24-28.
87. Rose, J.C., Jones, C.M., Kelly, R.T.,
Hargrave, B.Y. and Meis, P.J., (1983).
A vasopressin antagonist blocks the norepinephrine
and epinephrine responses to hemorrhage in the
fetus.
Endocrinology 112, 2314-2319.
88. Rudolph, A.M., and M.A. Heymann, (1970).
Circulatory changes during growth in the fetal
lamb.
Circ.Res. 26, 289-299.
89. Sarasa, Manuel and Salvador Climent, (1987).
Effects of Catecholamines on Early Development of
the Chick Embryo: Relationship to Effects of
Calcium and cAMP.
The Journal of Exp.Zoology 241: 181-190.

90. Schmidt, M., (1987).
Über den Glykogenstoffwechsel der Leber und des
Dottersacks beim Hühnerembryo.
Med.Vet. Diss., München.
91. Seidler, F.J., and Theodore A. Slotkin, (1985).
Adrenomedullary function in the neonatal rat:
responses to acute hypoxia.
J.Physiol. 1-16
92. Silver, M. & Edwards, A.V., (1980).
The development of the sympatho-adrenal system
with the assessment of the role of the adrenal
medulla in the fetus and neonate.
In Biogenic Amines in Development, ed.Parvez.H.
& Parvez,S., pp. 147-212. Amsterdam: Elsevier/
North Holland.
93. Slater, I.H., and C.E. Powell, (1957).
Blockade of adrenergic inhibitory receptor sites
by 1-(3',4',-dichlorophenyl)-2-isopropylamino-
ethanol hydrochloride.
Federation Proc.16, 336-342.

94. Slotkin, T.A., Smith, P.G., Lau, C. & Bareis, D.L., (1980).
Functional aspects of development of catecholamine biosynthesis and release in the sympathetic nervous system.
In Biogenic Amines in Development, ed. Parvez, H. & Parvez, S., pp. 147-212. Amsterdam: Elsevier/North Holland.
95. Stark, R.I., Wardlaw, S.L., Daniel, S.S., Husain, H.K., Sanocka, U.M., James, L.S. and Vande Wiele, R.L., (1982).
Vasopressin secretion induced by hypoxia in sheep: developmental changes and relationship to β -endorphin release.
Am.J. Obstet. Gynecol. 143, 204-213.
96. Tazawa, H., (1971).
Measurement of respirator parameters in blood of chicken embryo.
J. Appl. Physiol. 30, 17-20.

97. Tazawa, H., A.H.J. Visschedijk, J. Wittmann, and J. Piiper, (1983).
Gas exchange, blood gases and acid-base status in the chick before, during and after hatching.
Respiratory Physiology 53, 173-185.
98. Temple, G.F. and Metcalfe, (1970).
The effects of increased incubator oxygen tension or capillary development in the chick chorioallantois.
Respir.Physiol 9, 216-233.
99. Thoenen, H., Mueller, R.A. and Axelrod, J., (1969).
Trans-synaptic induction of adrenal tyrosine hydroxylase.
J. Pharmac.Exp.Ther. 169, 249-253.
100. Visschedijk, A.H.J., (1968a).
The air space and embryonic respiration.
1. The pattern of gaseous exchange in the fertile egg during the closing stages of incubation.
Br. Poult.Sci. 9, 173-184.

101. Visschedijk, A.H.J., (1968b).
The air space and embryonic respiration.
2. The times of pipping and hatching as
influenced by an artificially changed permeability
of the shell over the air space.
Br. Poult. Sci. 9, 185-196.
102. Wangenstein, O.D., and H. Rahn, (1970/71)_
Respiratory gas exchange by the avian embryo.
Respir. Physiol. 11, 31-45.
103. Weiner, N., (1960).
The distribution of monoamine oxidase and succinic
oxidase in brain.
J. Neurochem. 6, 79-86.
104. Weiner, N., (1970).
Regulation of norepinephrine synthesis.
In H.W. Elliott (ed.) Annual Review of Pharmacology,
Vol. 10, Annual Reviews, Palo Alto, pp. 273-290.
105. Williamsen, J.R., (1975).
Effects of epinephrine on glycogenolysis and
myocardial contractility pp. 605-637.

In: Greep R.O. Astwood E.B. Handbook of
Physiology, Section 7: Endocrinology, Volume VI.,
Adrenal Gland, Washington .

106. Windle, W.F., and J. Barcroft, (1938).
Some factors governing the initiation of
respiration in the chick.
Am.J. Physiol 121, 684-691.
107. Wittmann J. and Weiss A., (1980).
Studies on the metabolism of glycogen and adenine
nucleotides in embryonic chick liver at the end of
incubation.
Comp. Biochem. Physiol. Vol. 69 C, 1-6.
108. Wittmann J. and Weissenbeck, (1981).
The influence of gas composition in the air cell on
pipping and liver metabolism in embryonic chicks.
Biochem. Expo. Biol.
109. Wurtman, R.J. and Axelrod, J. (1966).
Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the
adrenal by adrenal cortical steroids.
J. Biol. Chem. 241, 2301-2306.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. J. Wittmann für die Überlassung des Themas, die stets gern gewährte Unterstützung und die Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn. Dr. J. Hammerl danke ich für die Einführung in die HPLC-Analytik.

Allen Mitarbeitern des Labors, besonders Herrn H. Kaltner danke ich für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Herrn Professor Dr. W. Kraft danke ich dafür, daß er mir die Benutzung des Blutgasanalysators ermöglichte.

Lebenslauf

Josef Prectl:	geb. am 18.12.1952 in Neukirchen
Eltern:	Alois Prectl, Bauer
	Maria Prectl, geb. Haigermoser
1959 - 1967	Volksschule Neukirchen
1967 - 1970	Ausbildung zum praktischen Landwirt
1970 - 1973	Berufsaufbauschule in Freilassing
1973 - 1976	Bayernkolleg in Augsburg
März 1976	Allgemeine Hochschulreife
ab April 1976	15 Monate Wehrdienst
1977 - 1979	3 Semester Chemiestudium an der TU München
1979 - 1980	Tätigkeit in der Landwirtschaft
1980 - 1986	Studium der Tiermedizin in München
Nov. 1986	Staatsexamen
1987 (Januar)	Beginn der Arbeiten für die vorgelegte Dissertation am Institut für Tierphysiologie in München
März - Dez. 1987	Teilzeitbeschäftigte wissenschaft- liche Hilfskraft am o.g. Institut
Seit Mai 1988	Assistent in tierärztlicher Gemischtpraxis in Landshut

